

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Ondřej Hodek

CHARAKTERIZACE SAMOORGANIZUJÍCÍCH SE MOLEKUL A
JEJICH APLIKACE V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE

Characterization of self-assembling molecules and their application in
capillary electrophoresis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 7. května 2015.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá využitím nově syntetizovaných derivátů α -cyklodextrinu, 2¹-O-cinnamyl- α -cyclodextrinu a 3¹-O-cinnamyl- α -cyclodextrinu, v kapilární elektroforéze. Jejich unikátní vlastností je tvorba agregátů ve vodném prostředí. Tyto agregáty jsou tvořeny pomocí inkluze fenylové skupiny jedné molekuly cyklodextrinu do kavity cyklodextrinu následujícího. Během práce byl testován vliv přídavku 2¹-O-cinnamyl- α -cyclodextrinu či 3¹-O-cinnamyl- α -cyclodextrinu do základního elektrolytu (BGE) na elektroforetické mobility osmnácti analytů. Devět analytů bylo měřeno ve formě kationtů (anilin, antipyrin, L-histidin, D,L-tyrosin, D,L-fenylalanin, *N*-(1-naftyl)ethylendiamin, 4-nitroanilin, p-aminoacetofenon a tyramin) a devět bylo měřeno ve formě aniontů (*N*-acetyl-D,L-fenylalanin, *N*-acetyl-D,L-tryptofan, *N*-benzoyl-D,L-fenylalanin, *N*-boc-D,L-tryptofan, *N*-FMOC-D,L-valin, *N*-FMOC-alanin, *N*-FMOC-D,L-leucin, D,L-3-fenylmléčná kyselina a (*R*)-(-)-mandlová kyselina). Elektroforetické mobility kationtů byly měřeny v základním elektrolytu o pH 2,2, posléze o pH 2,3 a anionty v základním elektrolytu o pH 8,0. Experimenty byly prováděny při teplotě 25 a 50 °C. Z počátku bylo pH pufru obsahujícího 2,5 mM TRIS upraveno na hodnotu 2,2 kyselinou trihydrogenfosforečnou. Avšak výsledky naznačovaly, že anionty kyseliny trihydrogenfosforečné jsou schopny inkludovat do kavit cyklodextrinů a blokovat tak případné interakce mezi analyty a deriváty α -cyklodextrinu. Z tohoto důvodu byl pro další měření kationtů použit základní elektrolyt složený z 0,11 M kyseliny mravenčí o pH 2,3 a pro měření aniontů byl používán 10 mM roztok TRIS, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 8,0. Elektroforetické mobility analytů byly proměřeny bez přídavku a při koncentraci 5 a 25 mM 2¹-O-cinnamyl- α -cyclodextrinu a 3¹-O-cinnamyl- α -cyclodextrinu v základním elektrolytu.

Přestože některé analyty byly chirální povahy, během experimentů nebyla pozorována žádná enantioselektivní separace. U některých analytů však došlo k významnému poklesu elektroforetických mobilit v přítomnosti derivátu α -cyklodextrinu. Největší pokles elektroforetických mobilit se projevil u 4-nitroanilinu a *N*-(1-naftyl)ethylendiaminu při pH 2,3 a u *N*-boc-D,L-tryptofanu, *N*-FMOC-D,L-valinu a *N*-FMOC-D,L-leucinu. Při zvýšení koncentrace cyklodextrinu v základním elektrolytu na 25 mM došlo k výraznému snížení elektroforetických mobilit všech analytů. Při srovnání 2¹-O-cinnamyl- α -cyclodextrinu s 3¹-O-

cinnamyl- α -cyclodextrinem se projevíly nespecifické interakce závislé na velikosti agregátů cyklodextrinů. V přítomnosti 2^I-O-cinnamyl- α -cyclodextrinu v BGE docházelo k výraznějšímu zpoždění analytů než v přítomnosti 3^I-O-cinnamyl- α -cyclodextrinu. Výjimku představoval *N*-(1-naftyl)ethyldiamin, jenž interagoval silněji s 3^I-O-cinnamyl- α -cyclodextrinem.

KLÍČOVÁ SLOVA

kapilární elektroforéza, samoskladné α -cyklodextriny, 2^I-O-cinnamyl- α -cyclodextrin, 3^I-O-cinnamyl- α -cyclodextrin

ABSTRACT

This diploma thesis deals with application of newly synthesized α -cyclodextrins derivatives, 2^I-O-cinnamyl- α -cyclodextrin and 3^I-O-cinnamyl- α -cyclodextrin, in capillary electrophoresis. Their unique feature lies in formation of cyclodextrin aggregates in an aqueous solution by inclusion of phenyl moiety of one molecule into cavity of another one. The influence of addition of 2^I-O-cinnamyl- α -CD and 3^I-O-cinnamyl- α -CD to background electrolyte (BGE) and its impact on effective mobilities of eighteen selected analytes were tested. Nine analytes were measured in the form of cations (aniline, antipyrine, L-histidine, D,L-tyrosine, D,L-phenylalanine, *N*-(1-naphtyl)ethylenediamine, 4-nitroaniline, p-aminoacetophenon and tyramine) and nine in the form of anions (*N*-acetyl-D,L-phenylalanine, *N*-acetyl-D,L-tryptophan, *N*-benzoyl-D,L-phenylalanine, *N*-boc-D,L-tryptophan, *N*-FMOC-D,L-valine, *N*-FMOC-alanine, *N*-FMOC-D,L-leucine, D,L-3-phenyllactic acid and (*R*)-(-)-mandelic acid). Electrophoretic mobilities of cations were tested in BGE at pH 2.2 and anions at pH 8.0. The measurements were conducted at 25 and 50 °C. At the beginning the buffer containing 2.5 mM TRIS was adjusted with phosphoric acid to pH 2.2. However, it was found, that phosphate anions might enter cyclodextrin cavity and disable potential interactions of analytes with cyclodextrin derivatives. Therefore, 0.11 M formic acid of pH 2.3 was used instead of buffer containing phosphoric acid (pH 2.2) and 10 mM TRIS was adjusted by formic acid to desired pH value of 8.0. The effective mobilities of the analytes were measured without and with presence of the individual CD derivative in BGE. The CD derivatives were added into BGE as aqueous solution with final concentration of 5 mM. Moreover, the electromigration behavior of analytes was also tested in BGE with 25 mM concentration of 3^I-O-cinnamyl- α -CD and 2^I-O-cinnamyl- α -CD at pH 2.3 and 8.0.

Even though some of the analytes are chiral, no enantioselective separation has been observed for any analyte. Nevertheless, significant differences of effective mobilities measured without and with presence of α -CD derivatives have occurred for several tested analytes. The biggest differences in effective mobilities have been observed for 4-nitroaniline and *N*-(1-naphtyl)ethylenediamine at pH 2.3 and for *N*-boc-D,L-tryptophane, *N*-FMOC-D,L-valine and *N*-FMOC-D,L-leucine at pH 8.0. Increase of concentration of cyclodextrin in BGE at 25 mM caused significant decrease of effective mobilities of all the tested analytes. Most of

the analytes have interacted stronger with 2^I-O-cinnamyl- α -CD than 3^I-O-cinnamyl- α -CD. *N*-(1-naphtyl)ethylenediamine represented an exception as its effective mobility decreased more in presence of 3^I-O-cinnamyl- α -CD.

KEYWORDS

capillary electrophoresis, self-assembling cyclodextrins, 2^I-O-cinnamyl- α -cyclodextrin, 3^I-O-cinnamyl- α -cyclodextrin

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat mému školiteli RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za jeho odborné a věcné rady při vedení mé experimentální práce a při vypracovávání této práce. Mé poděkování taktéž patří paní doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za pomoc při zpracovávání této práce. V neposlední řadě děkuji mé rodině za finanční i psychickou podporu při studiu.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	10
SEZNAM SYMBOLŮ	10
ÚVOD.....	11
1 TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1 Cyklodextriny	13
1.1.1 Struktura a vlastnosti.....	13
1.1.2 Inkluzní komplexy	15
1.2 Cyklodextriny v analytické chemii	17
1.2.1 Aplikace cyklodextrinů ve spektrometrických metodách.....	17
1.2.2 Aplikace cyklodextrinů v elektrochemických metodách.....	17
1.2.3 Aplikace cyklodextrinů v separačních metodách.....	18
1.3 Samoorganizující se systémy.....	21
1.3.1 Obecná charakteristika	21
1.3.2 Samoorganizující se cyklodextriny.....	21
2 CÍLE PRÁCE.....	24
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
3.1 Použité chemikálie a zařízení	25
3.1.1 Cyklodextriny	25
3.1.2 Standardy	25
3.1.3 Ostatní použité chemikálie	29
3.1.4 Použitá zařízení	29
3.2 Příprava roztoků.....	29
3.2.1 Příprava roztoků standardů a cyklodextrinů	29
3.2.2 Příprava základního elektrolytu.....	30
3.3 Specifikace CZE experimentu	30
3.4 Postup měření.....	30
3.4.1 Výběr vhodných analytů	30

3.4.2	Optimalizace podmínek měření.....	31
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	33
4.1	Vliv přídavku 2 ¹ -O-cinnamyl- α -cyklodextrinu na rychlost elektroosmotického toku	33
4.2	Měření analytů v základním elektrolytu obsahujícím kyselinu trihydrogenfosforečnou.....	34
4.3	Měření v základním elektrolytu s kyselinou mravenčí	39
4.3.1	Přídavek 5 mM 2 ¹ -O-cinnamyl- α -cyklodextrinu do základního elektrolytu	39
4.3.2	Přídavek 25 mM 2 ¹ -O-cinnamyl- α -cyklodextrinu do základního elektrolytu	43
4.4	Porovnání 2 ¹ -O-cinnamyl- α -cyklodextrinu s 3 ¹ -O-cinnamyl- α -cyklodextrinem	48
4.4.1	Derivatizovaný α -cyklodextrin jako 5 mM aditivum základního elektrolytu	48
4.4.2	Derivatizovaný α -cyklodextrin jako 25 mM aditivum základního elektrolytu	53
ZÁVĚR	58

SEZNAM ZKRATEK

1,2-DAA	1,2-diamino-anthrachinon
α -CD	α -cyklodextrin
β -CD	β -cyklodextrin
γ -CD	γ -cyklodextrin
BGE	základní elektrolyt (background electrolyte)
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
CGE	kapilární gelová elektroforéza (capillary gel electrophoresis)
DLS	dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering)
GLC	plynová rozdělovací chromatografie (gas-liquid chromatography)
GSC	plynová adsorpční chromatografie (gas-solid chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
NMR	nukleární magnetická resonance (nuclear magnetic resonance)
PEMPDA- β -CD	mono-6-deoxy-6-N,N,N,N',N',N'-pentamethyl-propylendiamonio-cyklomaltoheptosa
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi (reversed phase HPLC)
SAM	sebeskladné monovrstvy (self-assembled monolayers)
TLC	tenkovrstvá chromatografie (thin-layer chromatography)

SEZNAM SYMBOLŮ

μ_{eof}	elektroosmotická mobilita
μ_{eff}	efektivní elektroforetická mobilita
RSD	relativní směrodatná odchylka

ÚVOD

Kapilární elektroforéza (CE – capillary electrophoresis) je metoda založená na separaci iontů v elektrickém poli. K dělení látek dochází na základě rozdílů v jejich elektroforetických mobilitách a nejdůležitějším faktorem určujícím selektivitu systému je složení základního elektrolytu (BGE – background electrolyte). Nejjednodušším způsobem provedení je takzvaná kapilární zónová elektroforéza (CZE – capillary zone electrophoresis), při které dochází k separaci nabitých analytů (iontů) na základě jejich volné migrace v základním elektrolytu. Modifikaci základní kapilární elektroforetické metody představuje micelární elektrokinetická kapilární chromatografie^{1,2}, ve které je do základního elektrolytu přidávána povrchově aktivní látka tvořící micely, popřípadě i látka vytvářející mikroemulze³. V těchto systémech dochází kromě vlastní migrace analytů i k jejich rozdělování mezi polární základní elektrolyt a nepolární tzv. pseudostacionární fázi tvořenou micelami. Tato metoda je proto vhodná i pro separaci neutrálních látek. Další modifikací kapilární elektroforézy vznikla kapilární elektrochromatografie, která kombinuje techniky elektromigrační a chromatografické tím, že separační prostor je tvořen stacionární fází, ale hnací silou mobilní fáze není tlakový spád, jako u kolonové chromatografie, nýbrž elektroosmotický tok. Tato metoda nejčastěji slouží k separaci peptidů⁴, proteinů⁵ či přírodních látek⁶. Zařazením různých druhů gelů^{7,8} do separačního prostoru byla vyvinuta kapilární gelová elektroforéza⁹ (CGE – capillary gel electrophoresis). CE a CGE jsou rychle se rozvíjejícími technikami v oblasti analýzy proteinů^{10,11} i DNA (cit. ^{12,13}) a tyto separační metody byly také aplikovány na tzv. analýzy na čipu^{14,15}.

V kapilární gelové elektroforéze se používají dva druhy gelů: chemické a fyzikální. Chemické i fyzikální gely jsou tvořeny řetězci lineárních polymerů. Lineární řetězce chemických gelů jsou navíc zesíťovány a vykazují tak vyšší viskozitu, dochází k tvorbě kovalentních vazeb mezi řetězci a mohou být vytvořeny kovalentní vazby mezi gelem a stěnou kapiláry. Tyto skutečnosti znesnadňují výměnu gelu mezi analýzami a přispívají ke kratší životnosti kapiláry. Fyzikální gely nejsou vytvořeny pomocí kovalentních vazeb mezi řetězci polymeru a netvoří ani kovalentní vazby se stěnou kapiláry, vykazují tak nižší viskozitu a lze je snadno vyměnit mezi jednotlivými analýzami. I přesto, že před několika lety byly popsány některé výhody fyzikálních gelů¹⁶, běžně dostupné fyzikální gely používané v kapilární gelové

elektroforéze vykazují nízkou reprodukovatelnost a selektivitu^{8,17}. Před několika lety byly popsány výhody použití organických gelů pro elektroforetické metody¹⁷. Další možnost optimalizace v elektroforetických metodách poskytují supramolekulární polymery^{18,19}. Supramolekulární polymery jsou látky tvořené monomery schopnými samoorganizace ve vodném prostředí na základě působení nekovalentních interakcí. Tyto struktury mohou tvořit nepravé roztoky, supramolekulární gely nebo pseudostacionární a stacionární fáze.

Jedním z trendů v současném výzkumu je syntéza nových supramolekulárních polymerů na bázi cyklodextrinů. V elektroforéze se látky cyklodextrinového typu běžně používají jako chirální selektory. Ty však nevytváří takto složité struktury a analyty tak mohou interagovat jen s kavitou cyklodextrinu. Byly však připraveny nové deriváty cyklodextrinů, které fungují na principech supramolekulárních polymerů. Mohou tak v separačním prostředí vytvářet agregáty sloužící pro lepší separaci určitých analytů. Pro přípravu supramolekulárních polymerů je nutná znalost specifických syntetických postupů^{20,21}. Supramolekulární polymery nebyly zatím použity a prozkoumány v kapilární elektroforéze, ale mají nesporně mnoho výhod. Mezi ně patří snadno reprodukovatelná příprava, jednoduchý přenos do kapiláry a zpět, schopnost síťového efektu i enantioselektivní separace analytů. Byly popsány rozpustné supramolekulární polymery²² tvořící nepravé roztoky, vhodné pro optimalizaci kapilárních separací včetně potenciálních enantioselektivních separací.

Před několika lety byly Katedrou organické chemie PřF UK v Praze syntetizovány nové deriváty cyklodextrinů^{23,24}. Později bylo zjištěno, že 2^I-O-cinnamyl- α -CD, 3^I-O-cinnamyl- α -CD, 6^I-O-cinnamyl- α -CD a 3^I-O-cinnamyl- β -CD jsou látky schopné tvořit supramolekulární polymery. Ty jsou tvořeny ve vodném prostředí na základě tvorby intermolekulárních inkluzních komplexů a jejich velikost lze určit metodou dynamického rozptylu světla²⁵ (DLS – dynamic light scattering). Zvláštností nově syntetizovaných derivátů cyklodextrinů je jejich schopnost tvořit samoskladné agregáty ve vodném roztoku pomocí inkluze fenylové skupiny do kavity následujícího derivátu cyklodextrinu. Této vlastnosti by mohlo být využito při separaci látek chirální i achirální povahy v kapilární elektroforéze.

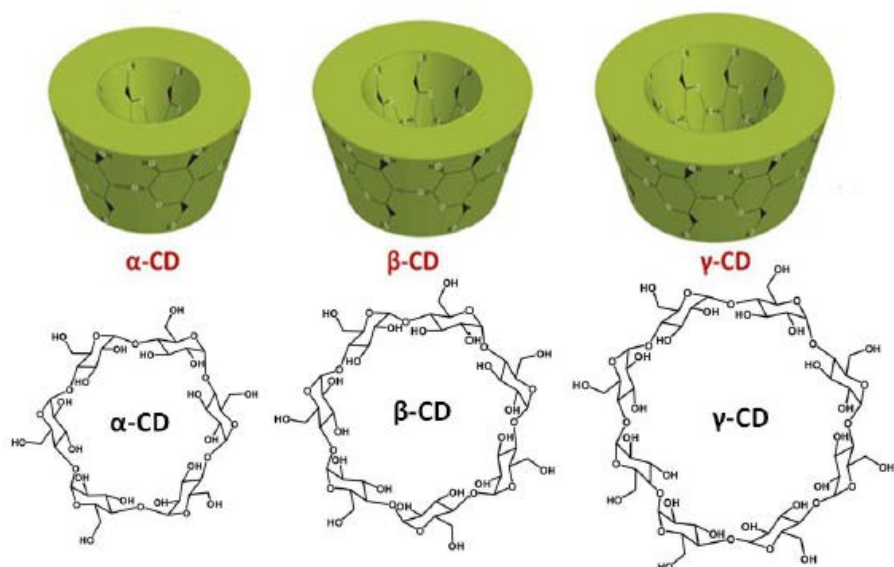
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Cyklodextriny

1.1.1 Struktura a vlastnosti

V roce 1891 Villiers studoval novou sloučeninu vzniklou degradací škrobu²⁶. Izoloval přibližně 3 gramy látky krystalické struktury, která byla později pojmenována jako cyklodextrin.

Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy vznikající enzymatickou degradací škrobu za přítomnosti *Bacillus macerans*²⁶. Tento biochemický proces poskytuje frakce lineárních i cyklických oligosacharidů. Nejžádanějšími produkty reakce jsou α -, β - a γ -cyklodextrin skládající se z 6, 7 a 8 D-glukopyranosových jednotek spojených α -1,4 vazbou (viz obr. 1). Tvar molekuly cyklodextrinu odpovídá tvaru komolého kužele, jehož dutý vnitřek se nazývá kavita. Zatímco vnitřní část kavity je hydrofobní povahy díky přítomnosti primárních hydroxylových skupin, vnější okraj je tvořen sekundárními hydroxylovými skupinami a vykazuje tak hydrofilní vlastnosti. Výsledkem je dobrá rozpustnost cyklodextrinů ve vodě a jejich schopnost tvořit inkluzní komplexy typu „host-hostitel“ s nepolárními molekulami nebo jejich částmi.



Obrázek 1. Struktura α -, β - a γ -cyklodextrinu²⁷

V molekule nativního cyklodextrinu dochází k tvorbě intramolekulárních vodíkových vazeb mezi hydroxylovou skupinou v poloze 2 jedné glukopyranosové jednotky a hydroxylovou skupinou v poloze 3 sousední glukopyranosové jednotky. Tímto způsobem je u β -cyklodextrinu (β -CD) vytvořen kompletní pás vodíkových vazeb, který je příčinou rigidity molekuly a nízké rozpustnosti ve vodě (viz tabulka 1).

Tabulka 1. Vybrané vlastnosti nativních cyklodextrinů^{26,28}

	α -CD	β -CD	γ -CD
počet glukopyranosových jednotek	6	7	8
relativní molekulová hmotnost	973	1135	1297
vnější průměr – okraj s prim. OH. sk. ^a	1,32	1,49	1,61
vnitřní průměr – okraj s prim. OH sk. ^a	0,45	0,61	0,77
vnější průměr – okraj se sek. OH sk. ^a	1,37	1,53	1,69
vnitřní průměr – okraj se sek. OH sk. ^a	0,57	0,68	0,95
objem kavity ^b	0,174	0,262	0,427
rozpustnost ve vodě ^c	14,5	1,85	23,2

^a v nm, ^b v nm³, ^c v g/100 ml

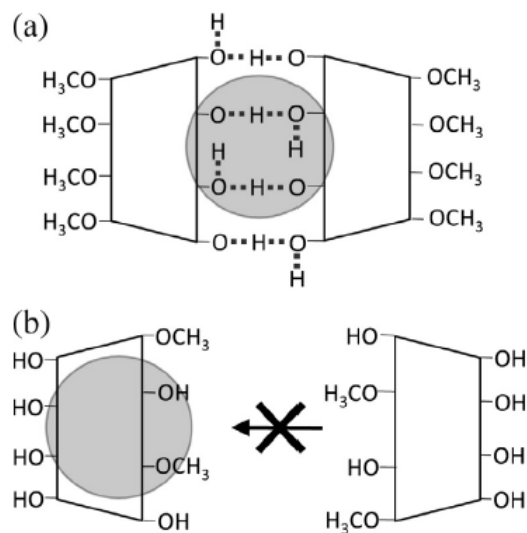
V molekule α -CD se tvoří jen 4 z 6 možných vodíkových vazeb, jelikož jedna glukopyranosová jednotka se nachází v distorzní pozici. Tato skutečnost přispívá k vyšší

rozpustnosti α -CD. Nejvíce rozpustným ve vodě je γ -CD díky nekoplanární konformaci jeho glukopyranosových jednotek, γ -CD tak má flexibilnější strukturu²⁶.

1.1.2 Inkluzní komplexy

Nativní i derivatizované formy cyklodextrinů tvoří inkluzní komplexy s mnoha látkami a nacházejí tak uplatnění v širokém spektru chemických disciplín, ve farmaceutickém průmyslu k dopravě účinných látek na požadované místo v organismu²⁹, v chemickém průmyslu jako katalyzátory chemických reakcí³⁰⁻³² nebo při výrobě polymerů²⁸.

Molekuly cyklodextrinů tvoří inkluzní komplexy s látkami nacházejícími se v kapalném, pevném i plynném stavu. Tyto komplexy vznikají inkluzí molekuly hosta nebo její části do kavity hostitele (cyclodextrin)²⁶. Inkluzní komplex mezi hostem a hostitelem je vytvořen pomocí vodíkových vazeb, hydrofobních interakcí, interakcí dipól-dipól a dalších nevazebných interakcí. Stechiometrie vzniklého komplexu s nativními³³⁻³⁵ i derivatizovanými³⁶⁻³⁸ α - nebo β -cyclodextriny je ve většině případů 1:1. Technikou NMR titrace byla zkoumána stochiometrie komplexů nativních i derivatizovaných α -cyclodextrinů s cyklickými alkoholy³⁹. Bylo zjištěno, že alkoholy s menším cyklem (cyklobutanol a cyklopentanol) tvoří inkluzní komplexy o stochiometrii 1:1. Vyšší cyklické alkoholy (cyklohexanol, cykloheptanol a cyklooktanol) mohou vytvářet komplexy o stochiometrii 1:1 i 2:1 (cyclodextrin:host) v závislosti na koncentraci cyklického alkoholu a α -cyclodextrinu. Pokud koncentrace hosta převyšuje koncentraci hostitele, jsou utvářeny komplexy stochiometrického poměru 1:1. V opačných případech vznikají komplexy typu 2:1. Některé derivatizované α -CD nemohou vytvářet komplexy typu 2:1 z důvodu nemožnosti vzniku intermolekulárních vodíkových vazeb mezi dvěma cyclodextriny (viz obr. 2).



Obrázek 2. **Vznik inkluzních komplexů**³⁸

- (a) Vznik inkluzního komplexu typu 2:1 mezi dvěma molekulami per-6-O-methyl- α -CD a vyššího cyklického alkoholu
- (b) Vznik komplexu typu 1:1 s per-2-O-methyl- α -CD, per-3-O-methyl- α -CD nebo per-2,6-O-dimethyl- α -CD

Cyklodextrin vytvářející komplex s molekulou hosta upravuje její vlastnosti²⁹. Kavita cyklodextrinu chrání zapouzdřenou molekulu před oxidací a mikroorganismy, zvyšuje její rozpustnost a modifikuje její chemickou reaktivitu.

1.2 Cyklodextriny v analytické chemii

1.2.1 Aplikace cyklodextrinů ve spektrometrických metodách

Cyklodextriny ovlivňují spektrometrické vlastnosti inkudovaných molekul a spektrometrické metody jsou proto využívány ke stanovení některých látek vytvářející komplexy s cyklodextriny⁴⁰, ke studiu inkluzních komplexů⁴¹ nebo k detekci cyklodextrinů⁴² v separačních metodách. Příkladem využití cyklodextrinů v této oblasti je spektrofotometrické stanovení palladnatého kationtu v UV oblasti za použití β -cyklodextrinu vytvářejícího komplex s molekulou 1,2-diamino-anthrachinonu⁴⁰ (1,2-DAA). Porovnáním fluorescenčních spekter 1,2-DAA rozpuštěného ve vodě s α -CD a ve vodě s β -CD bylo prokázáno, že došlo k posunu emisního maxima k vyšším vlnovým délkám a ke zvýšení intenzity emitovaného záření v případě přidavku β -CD. To prokazuje vznik komplexu mezi 1,2-DAA a β -CD. Ligand 1,2-DAA- β -CD vytváří s palladnatými ionty chelát modré barvy, jehož absorpční maximum se nachází při vlnové délce 660 nm. Tímto postupem byla vytvořena metoda molekulové absorpční spektrometrie pro stanovení palladnatých kationtů s mezí detekce v řádu 10^{-7} mol/l.

Pro stanovení γ -CD ve směsi s α -CD a β -CD byla vytvořena metoda založená na inkluzním komplexu bromkresolové zeleně s γ -CD (cit. ⁴³). Tento komplex poskytuje absorpční maximum při vlnové délce 630 nm.

Pro studium vzniklých inkluzních komplexů se využívá metoda NMR spektroskopie⁴¹, která umožňuje zjištění struktury komplexů a jejich stechiometrie i stanovení konstant stability komplexů jednotlivých enantiomerů.

1.2.2 Aplikace cyklodextrinů v elektrochemických metodách

Cyklodextriny nacházejí uplatnění při zvyšování selektivity elektroanalytických stanovení. Mezi hlavní elektrochemické metody využívající cyklodextriny patří potenciometrie a voltametrie. Příkladem potenciometrické metody je stanovení enantiomerní čistoty efedrinu v roztoku při fyziologické koncentraci některých kationtů (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) (cit. ⁴⁴). Enantiomerní čistota efedrinu je stanovena pomocí iontově-selektivní elektrody. Při vývoji této metody byl použit peroktylovaný cyklodextrin jako komponenta membrány elektrody a jako plastifikátor byl použit o-nitrofenyl-oktyl-ether.

Při voltametrických stanoveních dvou a více elektroaktivních látek v roztoku často nastává problém s překryvem jejich vln na základě podobnosti půlvolnových potenciálů těchto látek. Jednou z možností, jak od sebe rozlišit a stanovit dvě látky, jejichž signály se na voltamogramu překrývají, je přidání α -CD do analyzovaného roztoku⁴⁵. Této skutečnosti bylo využito při stanovení o-nitrofenolu v roztoku s nadbytkem p-nitrofenolu cyklickou voltametrií. V nepřítomnosti α -cyklodextrinu dochází k překryvu redukčního píku o-nitrofenolu redukčním píkem p-nitrofenolu, jelikož tyto isomery mají blízký půlvolnový potenciál. Bylo zjištěno, že p-nitrofenol tvoří silnější inkluzní komplex s α -CD než druhý isomer. Přítomností α -CD o koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ M v analyzovaném roztoku dochází ke snížení efektivního difuzního koeficientu p-nitrofenolu, jeho půlvolnový potenciál je tak posunut do zápornější hodnoty a zároveň je snížen signál tohoto isomeru. Touto metodou může být stanoven o-nitrofenol vedle nadbytku p-nitrofenolu.

Mimo to byla dokázána adsorpce α -CD a β -CD na rtuťovou kapkovou elektrodu, což způsobuje pokles povrchového napětí rtuť⁴⁶. V módu cyklické voltametrie byly stanoveny oba nativní cyklodextriny ve fosfátovém pufru o pH 6,5.

1.2.3 Aplikace cyklodextrinů v separačních metodách

V chromatografických i elektromigračních technikách jsou cyklodextriny a jejich deriváty používány k optimalizaci enantioselektivních separací. Cyklodextriny jsou přidávány jako aditivum do mobilní fáze či základního elektrolytu, nebo jsou imobilizovány ve formě stacionární fáze. Cyklodextriny i jejich deriváty byly využity při většině typů separací včetně tenkovrstvé chromatografie (TLC – thin-layer chromatography). V této technice je stacionární fáze ve většině případů tvořena silikagelem a mobilní fáze směsí organických rozpouštědel (acetón, kyselina octová, cyklohexan, chloroform a další). Byla vyvinuta TLC metoda s β -CD jakožto aditivem mobilní fáze⁴⁷. Problémem nativního β -CD je jeho nízká rozpustnost, která dovoluje vytvoření vodného roztoku o koncentraci maximálně 16,8 mM. Tento problém byl překonán přidáním močoviny k roztoku cyklodextrinu, jelikož bylo prokázáno, že přídavek močoviny k vodnému roztoku β -CD zvyšuje jeho rozpustnost. Přídavkem β -CD do mobilní fáze bylo separováno několik isomerů např. o-, m- a p-fenylfenol, o-, m- a p-kyanofenol a bylo prokázáno zvyšování retardačního faktoru většiny studovaných látek se zvyšováním koncentrace β -CD v mobilní fázi. Příkladem použití derivátu cyklodextrinu je přídavek HP- β -

CD (hydroxypropyl- β -cyklodextrin) do mobilní fáze složené ze směsi ethanolu, acetonitrilu, ledové kyseliny octové, diethylaminu a destilované vody⁴⁸. Tento systém je schopen enantioselektivní separace racemátů léčiv zopiclonu a ofloxacinu. Detekce enantiomerů byla prováděna densitometricky a bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací HP- β -CD v mobilní fázi klesá rozlišení zón jednotlivých enantiomerů. Druhou možností, jak optimalizovat separaci isomerů v TLC je navázání nativního β -CD na silikagelový nosič⁴⁹. Tato modifikace byla studována mimo jiné pro separaci o-, m- a p-nitroanilinu, o-, m- a p-nitrofenolu či derivatizovaných aminokyselin např. *N*-dansyl-D,L-leucinu.

Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC – high-performance liquid chromatography) existuje možnost přidavku cyklodextrinů, jakožto chirálních selektorů, přímo do mobilní fáze. Přídavek derivatizovaných cyklodextrinů do mobilní fáze se zpravidla uskutečňuje v reverzním módu (RP-HPLC)⁵⁰. Tímto způsobem však dochází k větší spotřebě nativních i derivatizovaných cyklodextrinů, které jsou drahé a složité na přípravu, a tak se začala omezovat jejich spotřeba. To se projevilo hlavně v HPLC vývojem stacionárních fází s navázanými cyklodextriny a omezením používání cyklodextrinů jako aditiv do mobilní fáze. Dnes je převládající technikou v HPLC enantioselektivní separace prováděná na chirálních stacionárních fázích. Při použití této separační techniky se převážně používají kolony s imobilizovanými cyklodextriny na nosiči, kterým je silikagel. Imobilizace se provádí chemickou vazbou mezi cyklodextrinem a tzv. „spacerem“, který je navázán na silikagel. Separace na těchto stacionárních fázích většinou probíhá v reverzním módu⁵¹⁻⁵⁵ a výjimečně v módu s normálními fázemi⁵⁶. V mnoha případech se jedná o nativní⁵¹ nebo derivatizovaný⁵²⁻⁵⁵ β -CD. Enantioselektivní separace v těchto systémech probíhá na základě komplexace analytů s cyklodextrinem a interakce s jejich hydroxylovými či substituovanými skupinami, může docházet i k nespecifickým interakcím se spacerem. Bylo zjištěno, že cyklodextriny mohou být adsorbovány z mobilní fáze na silikagelový nosič, aniž by s ním tvořily chemické vazby⁵⁷. Adsorpce bylo dosaženo použitím mobilní fáze složené z hexanu a propanolu (150:2 v/v) a přídavkem permethylovaného β -CD.

Cyklodextriny v pevném skupenství jsou schopny inkludovat plynné molekuly, což bylo prokázáno pomocí plynové adsorpční chromatografie (GSC – gas-solid chromatography) s náplňovými kolonami⁵⁸. Provedenými experimenty bylo v tomto případě prokázáno, že nativní α - a β -CD poskytují vyšší selektivitu systému při separaci vybraných isomerů než

jejich methylované deriváty. Nativní α -CD se také uplatnil při separaci stereoizomerů⁵⁹ v plynové rozdělovací chromatografii (GLC – gas-liquid chromatography). Avšak tyto metody disponovaly nízkou účinností a pro enantioselektivní separace v plynové chromatografii se proto nejčastěji používají acetylované⁶⁰, pentylované⁶¹⁻⁶³ či methylované⁶⁴ deriváty cyklodextrinů jako chirální selektory vyznačující se vysokou specificitou.

Cyklodextriny i jejich nabitě a neutrální deriváty jsou používány při optimalizaci separací v kapilární elektroforéze⁶⁵. Převážně však nacházejí uplatnění při enantioselektivních separacích⁶⁶⁻⁶⁸. Například pro stanovení chirální čistoty léčiv (např. methyldopa, levofloxacin) kapilární elektroforézou bylo validováno mnoho metod⁶⁹. K těmto účelům lze využít jak nativní cyklodextriny, tak i jejich neutrální či nabitě deriváty. Mezi neutrální deriváty patří například 2,3,6-trimethyl- β -CD, 2,6-dimethyl- β -CD nebo hydroxypropyl- β -CD, zatímco k nabitým derivátům se řadí hlavně sulfatované cyklodextriny jako sulfobutyl- β -CD či heptakis(2,3-dimethyl-6-sulfo)- β -CD. Cyklodextriny jsou přidávány do základního elektrolytu v koncentracích maximálně 150 mM v závislosti na povaze analytu, cyklodextrinu a velikosti rozdílu mezi konstantami stability komplexů jednotlivých enantiomerů. Při používání neutrálních derivátů cyklodextrinů lze separovat pouze nabitě molekuly analytů a většinou je zapotřebí vyšší koncentrace k dosažení požadované účinnosti. Přídavkem nabitých derivátů do základního elektrolytu lze separovat neutrální i nabitě analyty. Zatímco záporně nabitě persulfatované deriváty lze používat pouze v nižších koncentracích, aby nedocházelo k přehřívání kapiláry v důsledku vysokého proudu procházejícího základním elektrolytem, nenabitý náhodně substituovaný hydroxypropyl- β -CD lze použít i v koncentracích 60 mM. Nižší přídavky derivátů cyklodextrinů je možno aplikovat i při separacích, kdy analyt nese opačný náboj než derivát cyklodextrinu. Toho bylo využito v případě separace záporně nabitých enantiomerů *N*-*boc*-D,L-tryptofanu přídavkem kladně nabitého derivátu cyklodextrinu a bylo zjištěno, že k dostatečnému rozlišení dvou píků enantiomerů je postačující koncentrace PEMPDA- β -CD (mono-6-deoxy-6-N,N,N,N',N'-pentamethyl-propylendiamonio-cyklomaltoheptosa) v rozmezí 0,5-1,0 mM (cit. ⁷⁰). Krom toho byly úspěšně separovány enantiomery dalších aminokyselin pomocí cyklodextrinů. Tímto způsobem byl využit trimethyl- α -CD pro enantioselektivní separaci *N*-dansyl-D,L-leucinu a *N*-dansyl-D,L-fenylalaninu a nativní β - a γ -CD pro enantioselektivní separaci kyseliny *N*-dansyl-D,L-glutamové a kyseliny *N*-dansyl-D,L-asparagové, všechny cyklodextriny byly

přidávány do BGE v koncentraci 10 mM (cit. ⁷¹). Cyklodextriny však nemusí být využity pouze pro enantioselektivní separace, příkladem je optimalizace stanovení směsi aminokyselin v lidské plazmě přidavkem nativního β -CD o výsledné koncentraci 12,5 mM v BGE (cit. ⁷²).

1.3 Samoorganizující se systémy

1.3.1 Obecná charakteristika

Samoorganizující se systém je tvořen samoskladnými molekulami, které jsou schopny sdružovat se a vytvářet různé struktury v kapalně fázi, či na rozhraní kapalně a pevné fáze. Tyto celky jsou tvořeny na základě působení van der Waalsových sil mezi molekulami⁷³. K nejstudovanějším samoorganizujícím se systémům patří sebeskladné monovrstvy (SAM – self-assembled monolayers). Bylo objeveno, že molekuly alifatických thiolů mají schopnost adsorpce na povrch ušlechtilých kovů pomocí thiolové skupiny a organizace do sebeskladné monovrstvy na základě hydrofobních interakcí mezi řetězcí thiolů. Proces samoorganizace je proveden ponořením zlata do roztoku thiolů⁷⁴ a probíhá během několika hodin⁷³. Samoorganizující se molekuly lze využít i v ochraně kovů či slitin před korozi⁷⁵, jako aditiva do polymerů ke zlepšení jejich vlastností⁷⁶ nebo jako gemini surfaktanty⁷⁷.

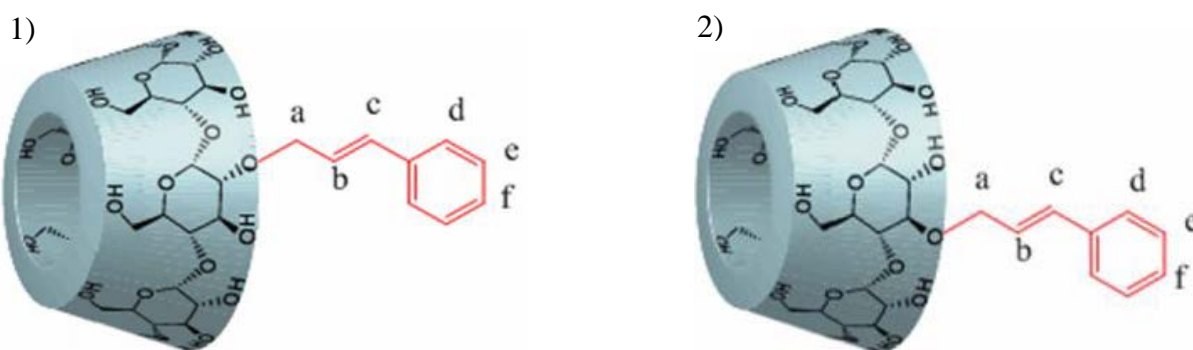
1.3.2 Samoorganizující se cyklodextriny

Nativní cyklodextriny tvoří ve vodném roztoku agregáty pomocí intermolekulárních vodíkových vazeb. Velikost těchto agregátů se pohybuje kolem 100 nm, avšak velice závisí na koncentraci cyklodextrinu – čím vyšší koncentrace, tím větší agregáty jsou tvořeny. Množství molekul podílejících se na tvorbě agregátů ale nepřesahuje 1 % z celkového množství rozpuštěného cyklodextrinu⁷⁸. Přidáním oxidu titaničitého do 8,8 mM roztoku β -CD a působením denního světla byla podpořena samoorganizace molekul cyklodextrinu, který vytvořil klubko samoorganizovaného β -cyklodextrinu u hladiny a shluky spolu s částicemi oxidu titaničitého u dna nádoby⁷⁹. Agregaci derivatizovaných cyklodextrinů lze také podpořit přidavkem vhodné molekuly, se kterou může cyklodextrin tvořit inkluzní komplex⁸⁰. Agregáty cyklodextrinů jsou převážně používány ve farmacii^{81,82} a ojediněle v biomimetice⁸³. Byl připraven derivát β -cyklodextrinu s thiolovou skupinou a byly provedeny elektrochemické experimenty se zlatou elektrodou pokrytou sebeskladnou monovrstvou tohoto derivátu⁸⁴.

Schopnosti tvořit inkluzní komplexy s thiolovaným β -CD bylo využito pro elektroanalytické stanovení 4-aminobifenyly na zlaté elektrodě⁸⁵.

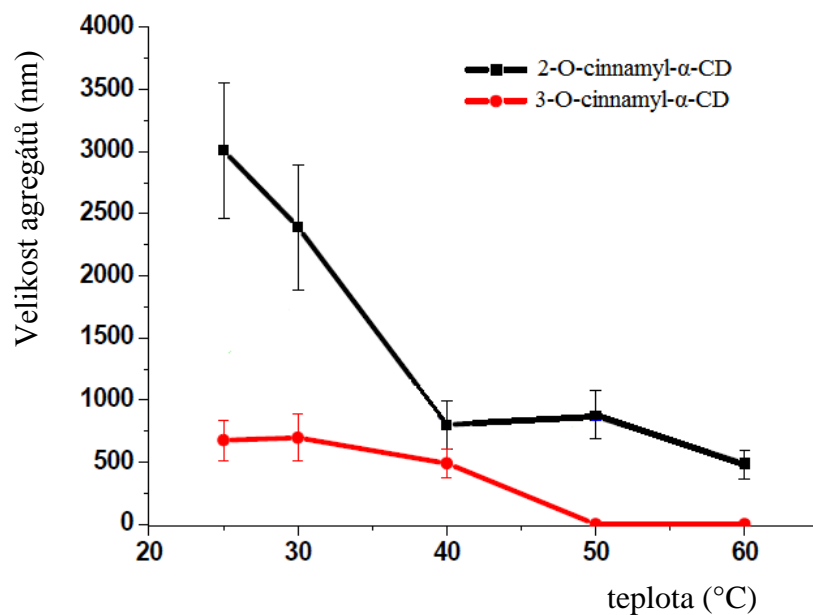
Cyklodextriny jsou využívány jako jedna ze složek při přípravě supramolekulárních polymerů. Ten může být složen z několika polymerních vláken, z nichž na jednom je navázán β -cyklodextrin a na druhém vhodná hostitelská skupina, propojením dojde k vytvoření supramolekulárního polymeru⁸⁶. Tyto polymery mohou být také složeny z monomerních jednotek obsahujících bis- β -cyklodextrin, který propojuje monomerní jednotky do řetězce^{87,88}.

U nově syntetizovaných derivátů α -cyklodextrinu byla objevena schopnost samoorganizace ve vodném prostředí na základě inkluze jedné fenylové skupiny derivatizovaného cyklodextrinu do kavity cyklodextrinu následujícího. Jedná se o 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrin a 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrin (viz obr. 3). Zatímco 2^I-O-cinnamyl- α -CD vytváří agregáty ve vodě i v 50 % methanolu, 3^I-O-cinnamyl- α -CD je schopen tvořit agregáty pouze ve vodném prostředí. Při teplotě 25 °C vytváří 2^I-O-cinnamyl- α -CD větší agregáty než 3^I-O-cinnamyl- α -CD a s rostoucí teplotou klesá velikost agregátů obou derivátů (viz obr. 4).



Obrázek 3 Struktura derivátů α -cyklodextrinu⁸⁹

- 1) 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrin
- 2) 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrin



Obrázek 4 Závislost velikosti agregátů cyklodextrinů na teplotě ve vodném prostředí⁸⁹

Příprava těchto derivátů α -cyklodextrinu probíhá na základě reakce cinnamyl bromidu s cyklodextrinem ve vodném roztoku s přidavkem acetonitrilu a hydroxidu sodného jako u jejich analogů derivátů β -cyklodextrinu (cit. ⁹⁰).

2 CÍLE PRÁCE

1. Proměřit elektroforetické mobility vybraných analytů za přítomnosti 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu nebo 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu v základním elektrolytu.
2. Statisticky porovnat vliv 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu a 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu a vliv teploty na elektroforetické mobility vybraných analytů.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a zařízení

3.1.1 Cyklodextriny

2¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrin a 3¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrin byly připraveny skupinou doc. RNDr. Jindřicha, CSc. na Katedře organické chemie, PřF UK.

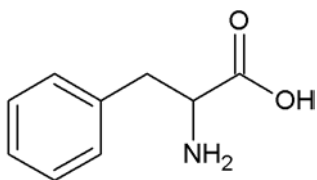
3.1.2 Standardy

Přehled použitých standardů je uveden v tabulce 2. Strukturní vzorce standardů jsou uvedeny na obrázcích 5 a 6.

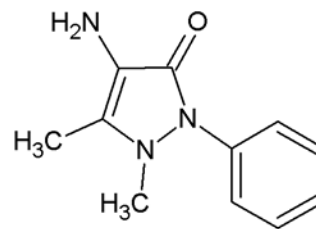
Tabulka 2. Přehled standardů

název standardu	čistota	výrobce
D,L-fenylalanin	99 %	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -acetyl-L-fenylalanin	99 %	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -acetyl-D-fenylalanin	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -boc-L-tryptofan	99,0 %	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -benzoyl-L-fenylalanin	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -benzoyl-D-fenylalanin	≥ 99,0%	Sigma-Aldrich
D,L-3-fenylmléčná kyselina	98 %	Sigma-Aldrich
L-(-)-3-fenylmléčná kyselina	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -boc-D-tryptofan	≥ 98,0 %	Sigma-Aldrich
(<i>R</i>)-(-)-mandlová kyselina	98 %	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -boc-D,L-fenylalanin	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -acetyl-L-tryptofan	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -acetyl-D,L-tryptofan	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich
D,L-tyrosin	99 %	Fluka
4-nitroanilin	99 %	Merck
4-amino-2,3-dimethyl-1-fenyl-3-pyrazolin-5-on	98%	Merck

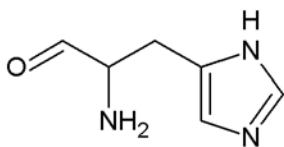
<i>N</i> -(1-naftyl)ethylendiamin	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
L-histidin	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
p-aminoacetofenon	99 %	Sigma-Aldrich
tyraminhydrochlorid	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
anilin	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
L-fenylalanin	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
D,L-fenylalanin	99 %	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -acetyl-D-fenylalanin	99 %	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -FMOC-L-valin	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -FMOC-D-valin	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -FMOC-L-leucin	≥ 97 %	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -FMOC-D-leucin	≥ 95 %	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -FMOC-L-alanin	95 %	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -FMOC-D-alanin	≥ 98 %	Sigma-Aldrich



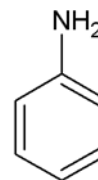
fenylalanin



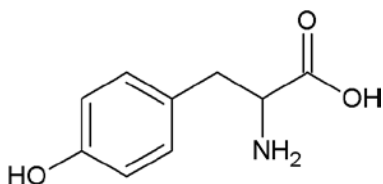
4-amino-2,3-dimethyl-1-fenyl-3-pyrazolin-5-on



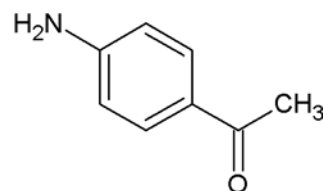
histidin



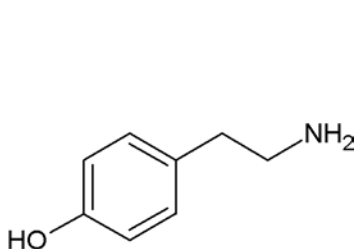
anilin



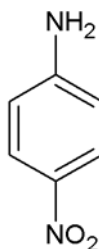
tyrosin



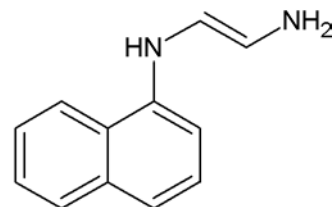
p-aminoacetofenon



tyramin

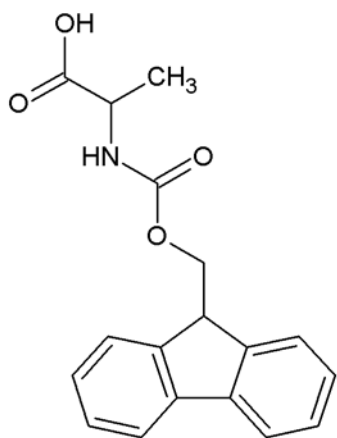


4-nitroanilin

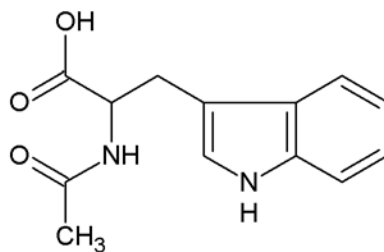


N-(1-naftyl)ethylendiamin

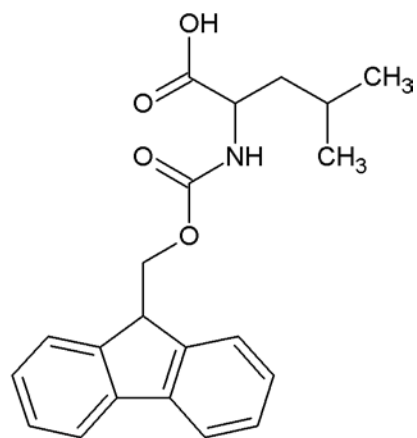
Obrázek 5. Struktura analytů měřených ve formě kationtů



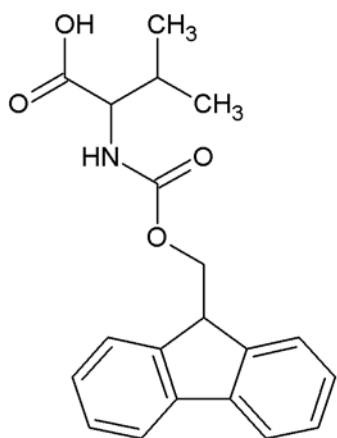
N-FMOC-alanin



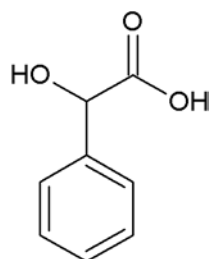
N-acetyl-tryptofan



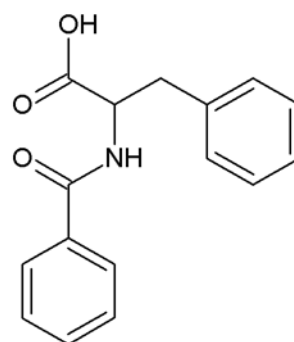
N-FMOC-leucin



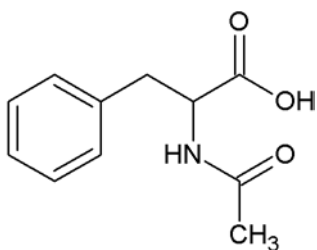
N-FMOC-valin



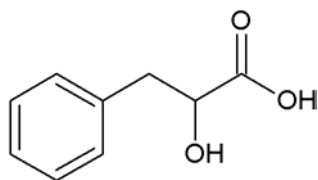
mandlová kyselina



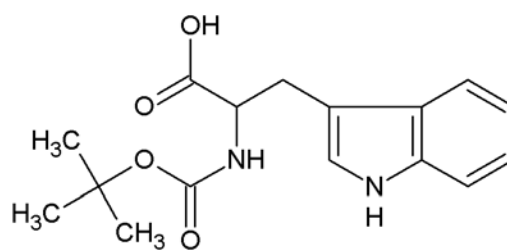
N-benzoyl-fenylalanin



N-acetyl-fenylalanin



fenylmléčná kyselina



N-boc-tryptofan

Obrázek 6. Struktura analytů měřených ve formě aniontů

3.1.3 Ostatní použité chemikálie

- tris(hydroxymethyl)aminomethan (čistota p.a.), Lachema, Brno, ČR
- kyselina trihydrogenfosforečná 85%, Lach-Ner s.r.o. Neratovice, ČR
- hydroxid sodný (čistota p.a.), Lach-Ner s.r.o. Neratovice, ČR
- kyselina mravenčí 98-100 %, Merck, SRN
- deionizovaná voda Milli Q byla odebírána z přístroje Millipore, Milford, USA

3.1.4 Použitá zařízení

- analytické váhy, Precisa Instrument 290 SCS, Precisa, Švýcarsko
- pH metr, Jenway 3540, UK
- ultrazvuk LC30H, Elma, ČR
- G7100A – 7100 Capillary Electrophoresis Instrument s UV-VIS spektrofotometrickým detektorem, Agilent Technologies, USA
- kapiláry z taveného křemene s nemodifikovaným vnitřním povrchem o vnitřním průměru 50 μm a vnějším průměru 375 μm (CACO, Slovensko)

3.2 Příprava roztoků

3.2.1 Příprava roztoků standardů a cyklodextrinů

Všechny zásobní roztoky standardů o koncentraci 1 mg/ml byly připraveny rozpuštěním standardů v deionizované vodě. Některé roztoky standardů (*N*-FMOC-L-valin, *N*-FMOC-D-valin, *N*-FMOC-L-alanin, *N*-FMOC-D-alanin, *N*-FMOC-L-leucin a *N*-FMOC-D-leucin) bylo zapotřebí podrobit sonifikaci po dobu 10 minut pro jejich úplné rozpuštění.

Roztoky 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu a 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu byly připraveny rozpuštěním příslušného množství cyklodextrinu ve vodě. Byly připraveny zásobní roztoky cyklodextrinů o koncentracích 10 a 50 mM.

3.2.2 Příprava základního elektrolytu

TRIS pufr byl připraven pomocí vodného roztoku tris(hydroxymethyl)aminomethanu o koncentraci 5 mM, pomocí kyseliny trihydrogenfosforečné bylo pH upraveno na hodnotu 2,2. Pro následná měření při pH 2,3 byl použit základní elektrolyt tvořený kyselinou mravenčí o koncentraci 0,23 M.

TRIS pufr pro měření v mírně zásaditém prostředí byl připraven pomocí vodného roztoku tris(hydroxymethyl)aminomethanu o koncentraci 20 mM, pH bylo upraveno na hodnotu 8,0 přidavkem kyseliny trihydrogenfosforečné. Pro pozdější měření bylo pH TRIS pufru upravováno na pH 8,0 pomocí kyseliny mravenčí.

3.3 Specifikace CZE experimentu

Před každou sadou měření byla kapilára promyta 1 M roztokem hydroxidu sodného po dobu 10 minut a následně deionizovanou vodou po dobu 5 minut. Mezi jednotlivými měřeními byla kapilára kondicionována po dobu 2 minut základním elektrolytem. Dávkování roztoků standardů bylo prováděno hydrodynamicky tlakem 5 kPa po dobu 5 sekund a napětí vložené na kapiláru mělo hodnotu 30 kV. Detekce byla prováděna spektrofotometricky při vlnových délkách 214, 223 a 254 nm. Všechna měření analytů s přidavkem i bez přidavku cyklodextrinu do BGE byla provedena třikrát.

Pro separaci byla použita křemenná kapilára potažená vrstvou polyimidu. Celková délka kapiláry byla 50 cm, délka k detekčnímu okénku 41,5 cm a její vnitřní průměr byl 50 μm . Měření probíhala při dvou různých teplotách: 25 a 50 $^{\circ}\text{C}$.

3.4 Postup měření

3.4.1 Výběr vhodných analytů

Analyty byly vybírány na základě jejich struktury dle několika hledisek. Byly vybrány analyty obsahující chromofor, například v podobě fenylové či fluorenyl-methoxykarbonylové skupiny, aby bylo možné je detegovat při používaných vlnových délkách (214, 223 a 254 nm). Hydrofobní chromofory analytů navíc podporovaly interakce mezi analyty a kavítami cyklodextrinů. V případě chirálních analytů byly zařazeny oba

enantiomery pro studium případných chirálních interakcí s cyklodextriny. Dalším kritériem pro výběr analytů byla jejich schopnost nést v použitých základních elektrolytech kladný či záporný náboj, a proto byly vybírány analyty s amino či karboxylovými skupinami.

3.4.2 Optimalizace podmínek měření

Nejdříve byl pro přípravu BGE používán 5 mM TRIS pufr, jehož pH bylo upraveno kyselinou trihydrogenfosforečnou na hodnotu 2,2. Pufr byl před měřením ředěn vodou v poměru 1:1 (v/v) pro simulaci následných podmínek měření s přidavkem 2^I-O-cinnamyl- α -CD, výsledná koncentrace TRIS pufru tedy byla 2,5 mM. V tomto pufru byly proměřeny analyty (viz obr. 5) ve formě kationtů při teplotách 25 a 50 °C. Jako marker elektroosmotického toku byl použit přídavek thiomočoviny ke vzorku. Poté byla provedena měření při pH 2,2 v témže pufru, který byl smíchán s vodným roztokem 2^I-O-cinnamyl- α -CD v poměru 1:1 (v/v), výsledná koncentrace cyklodextrinu v základním elektrolytu byla 5 mM. Marker elektroosmotického toku nebylo třeba používat, jelikož 2^I-O-cinnamyl- α -CD absorbuje UV záření v měřených oblastech a zóna vody z nadávkovaného vzorku pohybující se elektroosmotickou rychlostí tak poskytovala záporný pík. Následně byly proměřeny analyty (viz obr. 6) ve formě aniontů v BGE o pH 8,0, pro jehož přípravu byl použit 20 mM TRIS pufr a pH bylo upraveno kyselinou trihydrogenfosforečnou. Při měření analytů bez přídavku 2^I-O-cinnamyl- α -CD byl pufr smíchán s deionizovanou vodou v poměru 1:1 (v/v). Při měření s přídavkem 2^I-O-cinnamyl- α -CD byl pufr smíchán s vodným roztokem cyklodextrinu v poměru 1:1 (v/v). Výsledná koncentrace TRIS pufru v BGE při pH 8,0 tedy byla 10 mM a koncentrace 2^I-O-cinnamyl- α -CD byla 5 mM.

Z důvodu podezření na interakce mezi cyklodextriny a anionty kyseliny trihydrogenfosforečné byla pro přípravu základních elektrolytů používána kyselina mravenčí. K následujícím měřením tak byl používán 20 mM TRIS pufr, jehož pH bylo upraveno kyselinou mravenčí na hodnotu 8,0 a pro měření při pH 2,3 byla použita 0,23 M kyselina mravenčí. Základní elektrolyty byly před měřením ředěny 1:1 (v/v) s vodou či s cyklodextrinem, takže výsledná koncentrace tris(hydroxymethyl)aminomethanu v základním elektrolytu byla 10 mM při pH 8,0 a základní elektrolyt o pH 2,3 byl tvořen kyselinou mravenčí o koncentraci 0,11 M. V těchto pufrech byly proměřeny analyty bez přídavku cyklodextrinu, s přídavkem 2^I-O-cinnamyl- α -CD o koncentraci 5 mM v BGE, s přídavkem 2^I-

O-cinnamyl- α -CD o koncentraci 25 mM v BGE, s přidavkem 3^I -O-cinnamyl- α -CD o koncentraci 5 mM v BGE a s přidavkem 3^I -O-cinnamyl- α -CD o koncentraci 25 mM v BGE. Měření probíhala dle stejného postupu jako v případě měření v pufrch s kyselinou trihydrogenfosforečnou.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Vliv přídavku 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu na rychlost elektroosmotického toku

Porovnáním hodnot elektroosmotických mobilit bylo zjištěno, že přídavek 2^I-O-cinnamyl- α -CD do základního elektrolytu tvořeného 2,5 mM TRIS pufrům a kyselinou trihydrogenfosforečnou urychluje elektroosmotický tok při 25 i 50 °C. Stejně tak byl urychlen elektroosmotický tok i v základním elektrolytu tvořeném 0,11 M kyselinou mravenčí o pH 2,3 při 25 °C (viz tabulka 3).

Tabulka 3. Porovnání elektroosmotických mobilit ve všech použitých základních elektrolytech s cyklodextrinem (5 mM) a bez cyklodextrinu, kde μ_{eof} představuje průměr elektroosmotické mobility z n měření ($n = 30$)

BGE	teplota	bez přídavku CD do BGE μ_{eof} [m ² /V.s]	RSD [%]	s přídavkem CD do BGE μ_{eof} [m ² /V.s]	RSD [%]	rozdíl μ_{eof} [%]
2,5 mM TRIS +	25 °C	$6,82 \cdot 10^{-9}$	6,9	$1,24 \cdot 10^{-8}$	1,5	-45,2 [*]
H ₃ PO ₄ (pH 2,2)	50 °C	$1,26 \cdot 10^{-8}$	2,7	$1,89 \cdot 10^{-8}$	1,7	-33,3 [*]
10 mM TRIS +	25 °C	$4,23 \cdot 10^{-6}$	7,2	$3,72 \cdot 10^{-6}$	2,7	11,9
H ₃ PO ₄ (pH 8,0)	50 °C	$6,32 \cdot 10^{-6}$	4,8	$5,49 \cdot 10^{-6}$	4,7	13,1
0,11 M HCOOH	25 °C	$5,41 \cdot 10^{-7}$	20,2	$6,91 \cdot 10^{-7}$	11,2	-27,8 [*]
(pH 2,3)	50 °C	$1,20 \cdot 10^{-6}$	11,7	$1,14 \cdot 10^{-6}$	11,2	5,2
10 mM TRIS +	25 °C	$4,49 \cdot 10^{-6}$	8,3	$3,44 \cdot 10^{-6}$	1,2	23,5
HCOOH (pH 8,0)	50 °C	$6,40 \cdot 10^{-6}$	4,4	$4,38 \cdot 10^{-6}$	14,6	31,5

^{*} znaménko minus představuje urychlení elektroosmotického toku

Urychlení elektroosmotického toku přetrvávalo i v průběhu měření v základním elektrolytu bez přídavku cyklodextrinu, která byla provedena po měření v základním elektrolytu s přídavkem cyklodextrinu v těžce kapiláře. V případě použití nové kapiláry pro měření v základním elektrolytu bez cyklodextrinu nedocházelo k urychlení elektroosmotického toku. Tento jev mohl být způsoben adsorpcí 2^I-O-cinnamyl- α -CD na stěnu kapiláry a zároveň inkluzí aniontů kyseliny trihydrogenfosforečné do kavit molekul

cyklodextrinu. V pufrch o pH 8,0 a v základním elektrolytu o pH 2,3 a při 50 °C docházelo ke zpomalování elektroosmotického toku, které mohlo být způsobeno zvýšením viskozity základního elektrolytu.

4.2 Měření analytů v základním elektrolytu obsahujícím kyselinu trihydrogenfosforečnou

Proměřením elektroforetických mobilit analytů při 25 °C s přidavkem a bez přidavku 5 mM 2¹-O-cinnamyl- α -CD do základního elektrolytu tvořeného 2,5 mM TRIS pufrém a kyselinou trihydrogenfosforečnou o pH 2,2 byly získány hodnoty efektivních elektroforetických mobilit analytů shrnutých a porovnaných v tabulce 4.

Tabulka 4. **Porovnání efektivních elektroforetických mobilit kationtů měřených v BGE (pH 2,2) s 5 mM 2¹-O-cinnamyl- α -CD a při teplotě 25 °C**, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z n měření ($n = 3$). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému t -testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s cyklodextrinem od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE bez cyklodextrinu a je vyjádřena v procentech.

název analytu	bez přidavku CD do BGE		s přidavkem CD do BGE		t -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
anilin	3,49	5,7	3,24	1,3	V	7,4
antipyrin	3,11	3,9	2,73	0,2	V	12,1
L-histidin	3,25	5,8	3,20	0,5	NV	1,6
D,L-tyrosin	1,47	7,3	1,34	1,2	NV	8,6
D,L-fenylalanin	1,59	4,1	1,43	0,3	NV	10,1
<i>N</i> -(1-naftyl)ethylendiamin	2,96	1,3	2,12	3,9	V	28,5
4-nitroanilin	1,69	9,9	0,08	9,7	V	95,5
p-aminoacetofenon	1,79	3,6	1,57	6,0	V	12,2
tyramin	3,37	5,3	3,17	0,2	NV	6,1

Z tabulky 4 je patrné, že anilin, tyramin a L-histidin vykazují nejvyšší hodnoty efektivních elektroforetických mobilit jak v BGE bez přidavku, tak v BGE s přidavkem 5 mM 2¹-O-cinnamyl- α -CD. D,L-tyrosin, D,L-fenylalanin, 4-nitroanilin a p-aminoacetofenon jsou

naopak analyty, jejichž kationty se pohybují nízkou rychlostí a hodnoty jejich efektivních elektroforetických mobilit nabývají nejnižších hodnot za daných podmínek. Největší rozdíly v elektroforetických mobilitách mezi měřeními v BGE bez cyklodextrinu a v BGE s cyklodextrinem byly pozorovány u antipyrinu, *N*-(1-naftyl)ethylendiaminu, *p*-aminoacetofenonu a 4-nitroanilinu. Je zřejmé, že 4-nitroanilin byl z vybraných analytů nejvíce zpožděván 2¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem, výsledkem bylo snížení jeho efektivní elektroforetické mobility o 95,5 %.

Tytéž analyty byly proměřeny ve stejném základním elektrolytu při 50 °C a jejich efektivní elektroforetické mobility s přidavkem a bez přidavku 5 mM 2¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu do BGE byly porovnány provedením dvousměrného *t*-testu (viz tabulka 5).

Tabulka 5. **Porovnání efektivních elektroforetických mobilit kationtů měřených v BGE (pH 2,2) s 5 mM 2¹-O-cinnamyl- α -CD a při teplotě 50 °C**, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z *n* měření (*n* = 3). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému *t*-testu na hladině významnosti α = 0,05. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s cyklodextrinem od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE bez cyklodextrinu a je vyjádřena v procentech.

název analytu	bez přidavku CD do BGE		s přidavkem CD do BGE		<i>t</i> -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
anilin	5,15	1,6	5,10	0,7	NV	1,0
antipyrin	4,55	1,3	4,17	0,1	V	8,2
L-histidin	4,36	2,9	4,33	0,6	NV	0,6
D,L-tyrosin	2,06	1,1	2,06	0,2	NV	0,1
D,L-fenylalanin	2,17	1,1	2,08	0,5	V	4,5
<i>N</i> -(1-naftyl)ethylendiamin	4,80	1,0	3,90	4,9	V	18,8
4-nitroanilin	0,50	7,3	0,15	10,1	V	71,0
<i>p</i> -aminoacetofenon	1,81	1,8	1,76	2,2	NV	2,9
tyramin	4,76	0,8	4,74	0,5	NV	0,4

Data uvedená v tabulce 5 naznačují, že při zvýšení teploty měření na 50 °C dochází k urychlení kationtů všech analytů díky snížení viskozity BGE. Výjimkou je 4-nitroanilin, jehož efektivní elektroforetická mobilita z neznámých důvodů poklesla oproti měření

provedenému při 25 °C. Rovněž došlo ke snížení rozdílů v efektivních elektroforetických mobilitách ostatních analytů získaných měření v základním elektrolytu bez cyklodextrinu a v základním elektrolytu s cyklodextrinem. Rozdíl mobilit 4-nitroanilinu poklesl z hodnoty 95,5 % při 25 °C na 71,0 % při 50 °C. Stejně tak poklesly rozdíly mobilit analytů významně interagujících s cyklodextrinem, jedná se o antipyrin, D,L-fenylalanin a *N*-(1-naftyl)-ethylendiamin. Vliv na snižování rozdílů elektroforetických mobilit při 50 °C oproti 25 °C mohlo mít zmenšení agregátů 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu a změna viskozity základního elektrolytu.

Vzhledem k uvedeným výsledkům lze konstatovat, že 4-nitroanilin interaguje s 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem nejsilněji ze zkoušených analytů měřených ve formě kationtů, zatímco anilin interaguje prokazatelně slaběji. Z toho lze usuzovat na důležitou roli nitro skupiny ve struktuře 4-nitroanilinu, kterou hraje v interakci s 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem.

V 10 mM TRIS pufru, jehož pH bylo nastaveno kyselinou trihydrogenfosforečnou na hodnotu 8,0, byly proměřeny elektroforetické mobility analytů (viz obr. 6) ve formě aniontů. Tato měření probíhala bez přídavku a s přídavkem 5 mM 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu do základního elektrolytu a byla provedena při 25 °C (viz tabulka 6) a při 50 °C (viz tabulka 7).

Tabulka 6. **Porovnání efektivních elektroforetických mobilit aniontů měřených v BGE (pH 8,0) s 5 mM 2^I-O-cinnamyl- α -CD a při teplotě 25 °C**, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z n měření ($n = 3$). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému t -testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s cyklodextrinem od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE bez cyklodextrinu a je vyjádřena v procentech.

název analytu	bez přidavku CD do BGE		s přidavkem CD do BGE		t -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
<i>N</i> -acetyl-D,L-fenylalanin	-2,42	0,6	-2,33	0,3	V	4,0
<i>N</i> -acetyl-D,L-tryptofan	-2,25	1,2	-2,20	2,2	NV	1,9
<i>N</i> -benzoyl-D,L-fenylalanin	-2,11	2,1	-2,10	2,5	NV	0,5
<i>N</i> -boc-D,L-tryptofan	-2,02	2,3	-1,96	2,2	NV	2,9
<i>N</i> -FMOC-D,L-valin	-2,13	1,1	-1,76	2,8	V	17,5
<i>N</i> -FMOC-D,L-alanin	-2,24	0,5	-1,82	6,8	V	18,8
<i>N</i> -FMOC-D,L-leucin	-2,04	0,6	-1,73	8,0	V	15,4
D,L-3-fenylmléčná kyselina	-2,78	1,9	-2,72	1,5	NV	2,0
(<i>R</i>)-(-)-mandlová kyselina	-2,98	0,3	-2,86	1,5	V	3,8

2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrin je za daného pH neutrální a v případě jeho interakce s anionty tak snižuje hodnotu efektivní elektroforetické mobility analytů. Z tabulky 6 je zřejmé, že nejvyšší efektivní elektroforetickou mobilitou se pohybuje (*R*)-(-)-mandlová kyselina směrem k anodě, jak v nepřítomnosti cyklodextrinu v BGE tak s jeho přidavkem do BGE. Nejpomaleji pohybující se aniont v základním elektrolytu bez cyklodextrinu představuje *N*-boc-D,L-tryptofan. V roli aniontu s nejnižší efektivní elektroforetickou mobilitou v základním elektrolytu s cyklodextrinem vystupuje *N*-FMOC-D,L-leucin, který se řadí mezi pět analytů s významnými rozdíly v jejich efektivních elektroforetických mobilitách měřených v BGE bez cyklodextrinu a v BGE s přidavkem cyklodextrinu. Mezi tyto analyty dále patří *N*-acetyl-D,L-fenylalanin, *N*-FMOC-D,L-valin, *N*-FMOC-D,L-alanin a (*R*)-(-)-mandlová kyselina. Lze předpokládat, že interakcí s cyklodextrinem se účastní především fenylová skupina v případě (*R*)-(-)-mandlové kyseliny a *N*-acetyl-D,L-fenylalaninu a fluorenyl-methoxykarbonylová skupina v případě *N*-FMOC-D,L-valinu, *N*-FMOC-D,L-alaninu a *N*-FMOC-D,L-leucinu.

Tabulka 7. **Porovnání efektivních elektroforetických mobilit aniontů měřených v BGE (pH 8,0) s 5 mM 2^I-O-cinnamyl- α -CD a při teplotě 50 °C**, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z n měření ($n = 3$). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému t -testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s cyklodextrinem od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE bez cyklodextrinu a je vyjádřena v procentech.

název analytu	bez přidavku CD do BGE		s přidavkem CD do BGE		t -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
<i>N</i> -acetyl-D,L-fenylalanin	-3,87	8,5	-3,81	7,8	NV	1,6
<i>N</i> -acetyl-D,L-tryptofan	-3,89	0,3	-3,62	0,3	V	7,1
<i>N</i> -benzoyl-D,L-fenylalanin	-3,81	0,1	-3,49	0,6	V	8,3
<i>N</i> -boc-D,L-tryptofan	-3,49	1,2	-3,21	0,6	V	7,8
<i>N</i> -FMOC-D,L-valin	-3,05	3,0	-2,77	9,2	V	9,4
<i>N</i> -FMOC-D,L-alanin	-3,14	8,9	-3,06	0,5	NV	2,4
<i>N</i> -FMOC-D,L-leucin	-2,94	1,6	-2,76	0,7	V	6,1
D,L-3-fenylmléčná kyselina	-4,48	0,7	-4,47	0,9	NV	0,2
(<i>R</i>)-(-)-mandlová kyselina	-5,01	0,1	-4,78	1,0	V	4,5

Při zvýšení teploty měření na 50 °C opět došlo k nárůstu efektivních elektroforetických mobilit všech aniontů (viz tabulka 7) v důsledku snížení viskozity základního elektrolytu. U silně interagujících aniontů se snížily rozdíly efektivních elektroforetických mobilit oproti měřením při 25 °C. Nejsilněji interagujícím analytem při 50 °C je *N*-FMOC-D,L-valin, zatímco D,L-3-fenylmléčná kyselina interaguje s cyklodextrinem nejslaběji. Mezi významně interagující analyty se řadí *N*-acetyl-D,L-tryptofan, *N*-benzoyl-D,L-fenylalanin, *N*-boc-D,L-tryptofan, *N*-FMOC-D,L-valin, *N*-FMOC-D,L-leucin a (*R*)-(-)-mandlová kyselina. Dramatický pokles rozdílu v hodnotách efektivních elektroforetických mobilit byl pozorován u *N*-FMOC-D,L-alaninu, jehož rozdíl v efektivních elektroforetických mobilitách se snížil z 18,8 % při 25 °C na 2,4 % při 50 °C. Tato skutečnost nasvědčovala zadržování *N*-FMOC-D,L-alaninu agregáty cyklodextrinu, jejichž velikost je při 50 °C přibližně třikrát menší než při 25 °C.

Z uvedených údajů vyplývá, že 4-nitroanilin je nejsilněji interagujícím analytem s 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem z měřených analytů při 25 i 50 °C. Další silněji interagující analyt z okruhu kationtů představuje *N*-(1-naftyl)ethylendiamin. Nejvíce zpožděným

aniontem v pufru o pH 8,0 byl *N*-FMOC-D,L-alanin při 25 °C a *N*-FMOC-D,L-valin při 50 °C.

4.3 Měření v základním elektrolytu s kyselinou mravenčí

Z důvodu eliminace případného blokování kavit molekul cyklodextrinu anionty kyseliny trihydrogenfosforečné byla pro přípravu základního elektrolytu o pH 2,3 i 8,0 použita kyselina mravenčí. Základní elektrolyt o pH 2,3 byl tvořen 0,11 M kyselinou mravenčí a základní elektrolyt o pH 8,0 byl připraven z 10 mM roztoku tris(hydroxymethyl)-aminomethanu, jehož pH bylo nastaveno kyselinou mravenčí.

4.3.1 Přídavek 5 mM 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu do základního elektrolytu

V základním elektrolytu složeném z 0,11 M kyseliny mravenčí o pH 2,3 byly proměřeny kationty stejně tak jako tomu bylo v 2,5 mM TRIS pufru s kyselinou trihydrogenfosforečnou o pH 2,2. Nejdříve byly změřeny elektroforetické mobility kationtů při 25 °C bez přídavku a poté s přídavkem 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu. Tyto hodnoty byly porovnány a nacházejí se v tabulce 8.

Tabulka 8. **Porovnání efektivních elektroforetických mobilit kationtů měřených v BGE (pH 2,3) s 5 mM 2^I-O-cinnamyl- α -CD a při teplotě 25 °C**, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z n měření ($n = 3$). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému t -testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s cyklodextrinem od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE bez cyklodextrinu a je vyjádřena v procentech.

název analytu	bez přídavku CD do BGE		s přídavkem CD do BGE		t -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
anilin	4,40	0,2	4,27	1,5	V	2,9
antipyrin	2,87	0,2	2,80	0,5	V	2,3
L-histidin	3,76	0,5	3,69	0,6	V	1,7
D,L-tyrosin	1,35	0,3	1,34	0,1	V	1,4
D,L-fenylalanin	1,34	0,8	1,33	0,7	NV	1,3
<i>N</i> -(1-naftyl)ethylendiamin	3,20	0,3	2,88	0,4	V	10,1
4-nitroanilin	1,82	6,8	1,07	0,1	V	41,2
p-aminoacetofenon	1,49	5,4	1,44	0,7	NV	3,7
tyramin	3,39	1,8	3,38	1,2	NV	0,2

Kation s nejvyšší efektivní elektroforetickou mobilitou byl anilin a to jak bez přídavku, tak s přídavkem cyklodextrinu do BGE. Druhý nejrychleji se pohybující kation představuje L-histidin, dále následuje tyramin a *N*-(1-naftyl)ethylendiamin. Nejsilněji interagujícím analytem byl 4-nitroanilin stejně jako v předcházejících měřeních. Avšak za daných podmínek byla jeho mobilita snížena interakcí s cyklodextrinem o 41,2 %, zatímco v případě použití pufru s kyselinou trihydrogenfosforečnou se jednalo o 95,5 %. Mezi významně interagující analyty se dále řadí anilin, antipyrin, L-histidin, D,L-tyrosin a *N*-(1-naftyl)ethylendiamin.

Tytéž analyty byly proměřeny při teplotě 50 °C a jejich efektivní elektroforetické mobility byly porovnány stejným způsobem (viz tabulka 9).

Tabulka 9. **Porovnání efektivních elektroforetických mobilit kationtů měřených v BGE (pH 2,3) s 5 mM 2^I-O-cinnamyl- α -CD a při teplotě 50 °C**, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z n měření ($n = 3$). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému t -testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s cyklodextrinem od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE bez cyklodextrinu a je vyjádřena v procentech.

název analytu	bez přídavku CD do BGE		s přídavkem CD do BGE		t -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
anilin	6,18	0,4	5,94	5,4	NV	3,9
antipyrin	4,27	0,2	4,02	0,7	V	6,0
L-histidin	5,33	0,9	5,21	0,4	V	2,2
D,L-tyrosin	1,91	0,7	1,86	0,6	V	2,8
D,L-fenylalanin	1,94	0,6	1,81	2,0	V	7,1
<i>N</i> -(1-naftyl)ethylendiamin	4,64	0,6	4,31	0,7	V	7,2
4-nitroanilin	1,84	0,6	1,33	0,5	V	28,0
p-aminoacetofenon	1,54	1,9	1,50	0,4	NV	2,6
tyramin	5,17	0,3	4,91	0,3	V	5,0

Zvýšením teploty měření na 50 °C došlo k nárůstu efektivních elektroforetických mobilit všech analytů z důvodu snížení viskozity základního elektrolytu. Rovněž se projevil přetrvávající trend z předchozích měření – snížení rozdílů v efektivních elektroforetických mobilitách s rostoucí teplotou. Tento jev se projevil u silněji interagujících analytů jako 4-nitroanilinu a *N*-(1-naftyl)ethylendiaminu, u kterých došlo k poklesu o 13 %, respektive o 3 % oproti měřením při 25 °C. Nicméně u některých analytů se uskutečnil mírný nárůst rozdílů v efektivních elektroforetických mobilitách, jednalo se o antipyrin, L-histidin a D,L tyrosin. V případě D,L-fenylalaninu a tyraminu se interakce s cyklodextrinem při 50 °C zvýšila na významnou hladinu. Příčinou silnější interakce mohl být rozpad agregátů 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu, čímž se zpřístupnily kavity molekul cyklodextrinu pro interakce se zmíněnými analyty.

Následně byla provedena měření vybraných analytů ve formě aniontů při pH 8,0. Nejdříve byla měření vykonána při 25 °C a hodnoty efektivních elektroforetických mobilit aniontů byly porovnány v tabulce 10.

Tabulka 10. **Porovnání efektivních elektroforetických mobilit aniontů měřených v BGE (pH 8,0) s 5 mM 2^I-O-cinnamyl- α -CD a při teplotě 25 °C**, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z n měření ($n = 3$). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému t -testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s cyklodextrinem od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE bez cyklodextrinu a je vyjádřena v procentech.

název analytu	bez přidavku CD do BGE		s přidavkem CD do BGE		t -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
<i>N</i> -acetyl-D,L-fenylalanin	-2,92	18,1	-2,75	3,1	NV	5,9
<i>N</i> -acetyl-D,L-tryptofan	-2,79	0,3	-2,50	4,8	NV	10,5
<i>N</i> -benzoyl-D,L-fenylalanin	-2,64	0,4	-2,40	6,7	NV	9,4
<i>N</i> -boc-D,L-tryptofan	-2,52	0,6	-2,23	2,0	V	11,6
<i>N</i> -FMOC-D,L-valin	-2,24	1,0	-2,00	0,1	V	10,8
<i>N</i> -FMOC-D,L-alanin	-2,30	16,4	-2,10	0,8	NV	8,51
<i>N</i> -FMOC-D,L-leucin	-2,16	0,2	-1,94	1,3	V	10,5
D,L-3-fenylmléčná kyselina	-3,37	0,6	-3,18	1,3	NV	5,5
(<i>R</i>)-(-)-mandlová kyselina	-3,46	0,6	-3,20	15,6	NV	7,6

Nejrychleji pohybujícím se analytem je za daných podmínek měření (*R*)-(-)-mandlová kyselina i při přidavku 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu, stejně jako v případě měření v základním elektrolytu s kyselinou trihydrogenfosforečnou. Nejpomalejší aniont zastupuje *N*-FMOC-D,L-leucin.

Nejsilněji interagujícími analyty s cyklodextrinem byly *N*-boc-D,L-tryptofan, *N*-FMOC-D,L-valin a *N*-FMOC-D,L-leucin. Interakce s cyklodextrinem se v případě *N*-boc-D,L-tryptofanu mohla účastnit indolová skupina a v případě *N*-FMOC-D,L-valinu a *N*-FMOC-D,L-leucinu se interakce pravděpodobně účastnila fluorenyl-methyloxykarbonylová skupina. U ostatních analytů docházelo také ke zpomalování za přítomnosti cyklodextrinu v BGE, ale dle t -testu nebyly zpomalovány významně. Příčinou byly velké rozptyly některých souborů měření.

Efektivní elektroforetické mobility týchž analytů ve formě aniontů byly změřeny při 50 °C a porovnány v tabulce 11.

Tabulka 11. **Porovnání efektivních elektroforetických mobilit aniontů měřených v BGE (pH 8,0) s 5 mM 2^I-O-cinnamyl- α -CD a při teplotě 50 °C**, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z n měření ($n = 3$). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému t -testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s cyklodextrinem od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE bez cyklodextrinu a je vyjádřena v procentech.

název analytu	bez přídavku CD do BGE		s přídavkem CD do BGE		t -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
<i>N</i> -acetyl-D,L-fenylalanin	-4,28	5,7	-4,24	2,0	NV	0,9
<i>N</i> -acetyl-D,L-tryptofan	-3,87	0,5	-3,48	1,5	V	10,2
<i>N</i> -benzoyl-D,L-fenylalanin	-3,67	1,1	-3,45	1,7	V	6,0
<i>N</i> -boc-D,L-tryptofan	-3,45	0,4	-3,10	1,3	V	10,2
<i>N</i> -FMOC-D,L-valin	-3,31	4,5	-3,14	2,4	NV	5,2
<i>N</i> -FMOC-D,L-alanin	-3,15	0,3	-3,08	1,5	NV	1,9
<i>N</i> -FMOC-D,L-leucin	-2,96	0,3	-2,89	1,2	NV	2,6
D,L-3-fenylmléčná kyselina	-4,92	0,5	-4,83	1,1	NV	1,8
(<i>R</i>)-(-)-mandlová kyselina	-5,17	3,0	-4,92	1,3	NV	4,8

Z důvodu poklesu viskozity základního elektrolytu jeho zahřátím se urychlily všechny z měřených aniontů. Analytem s nejvyšší efektivní elektroforetickou mobilitou zůstala *R*-(-)-mandlová kyselina i po zvýšení teploty měření na 50 °C. Anionty o nejvyšších rozdílech v efektivních elektroforetických mobilitách s přídavkem a bez přídavku 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu představovaly *N*-acetyl-D,L-tryptofan, *N*-benzoyl-D,L-fenylalanin a *N*-boc-D,L-tryptofan.

U ostatních aniontů došlo k poklesu rozdílů v efektivních elektroforetických mobilitách oproti 25 °C.

4.3.2 Přídavek 25 mM 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu do základního elektrolytu

Po dokončení měření s 5 mM cyklodextrinem v základním elektrolytu byl přídavek 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu zvýšen na 25 mM. Měření probíhalo totožně jako v předcházejících experimentech. Nejdříve byly proměřeny kationty v základním elektrolytu tvořeném 0,11 M kyselinou mravenčí o pH 2,3 při teplotě 25 °C. Byly porovnány vypočtené

efektivní elektroforetické mobility kationtů v základním elektrolytu s přidavkem a bez přidavku cyklodextrinu (viz tabulka 12).

Tabulka 12. **Porovnání efektivních elektroforetických mobilit kationtů měřených v BGE (pH 2,3) s 25 mM 2¹-O-cinnamyl- α -CD a při teplotě 25 °C**, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z n měření ($n = 3$). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému t -testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s cyklodextrinem od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE bez cyklodextrinu a je vyjádřená v procentech.

název analytu	bez přidavku CD do BGE		s přidavkem CD do BGE		t -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
anilin	4,40	0,2	3,74	2,6	V	14,9
antipyrin	2,87	0,2	2,23	0,1	V	22,3
L-histidin	3,76	0,5	3,26	0,1	V	13,3
D,L-tyrosin	1,35	0,3	0,73	0,3	V	46,4
D,L-fenylalanin	1,34	0,8	0,69	0,2	V	48,8
<i>N</i> -(1-naftyl)ethylendiamin	3,20	0,3	2,51	0,1	V	21,7
4-nitroanilin*						
p-aminoacetofenon	1,49	5,4	0,77	0,2	V	49,0
tyramin	3,39	1,8	3,05	0,1	V	10,0

* nemožné detegovat zónu analytu při používaných vlnových délkách

Zvýšení koncentrace 2¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu v základním elektrolytu se projevilo nárůstem rozdílů v efektivních elektroforetických mobilitách kationtů bez přidavku a s přidavkem cyklodextrinu do základního elektrolytu. Statisticky významný rozdíl byl zaznamenán u všech analytů kromě 4-nitroanilinu, jehož zóna neposkytovala měřitelnou odezvu spektrofotometrického detektoru. Tento jev mohl být způsoben vyšší absorbancí základního elektrolytu v důsledku přítomnosti většího množství cyklodextrinu v kapiláře. Nejrychlejším kationtem v přítomnosti cyklodextrinu byl anilin, naopak nejpomalejší kation představoval D,L-tyrosin. Nejsilnější interakce s cyklodextrinem se projevily u p-aminoacetofenonu, D,L-fenylalaninu a D,L-tyrosinu, u kterých byl zároveň zaznamenán největší nárůst rozdílů v efektivních elektroforetických mobilitách oproti měření s 5 mM cyklodextrinem v základním elektrolytu. Statisticky významná interakce u všech kationtů poukazuje

na existenci nespecifických interakcí mezi analyty a 2¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu, které jsou způsobeny zvětšením agregátů cyklodextrinu.

Kationty byly následně proměřeny za stejných podmínek, ale při zvýšené teplotě 50 °C. Rozdíly v efektivních elektroforetických mobilitách analytů a jejich porovnání je uvedeno v tabulce 13.

Tabulka 13. **Porovnání efektivních elektroforetických mobilit kationtů měřených v BGE (pH 2,3) s 25 mM 2¹-O-cinnamyl- α -CD a při teplotě 50 °C**, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z n měření ($n = 3$). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému t -testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s cyklodextrinem od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE bez cyklodextrinu a je vyjádřena v procentech.

název analytu	bez přidavku CD do BGE		s přidavkem CD do BGE		t -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
anilin	6,18	0,4	4,72	3,7	V	23,7
antipyrin	4,27	0,2	3,49	0,2	V	18,3
L-histidin	5,33	0,9	4,51	0,6	V	15,3
D,L-tyrosin	1,91	0,7	1,08	0,6	V	43,3
D,L-fenylalanin	1,94	0,6	1,02	1,0	V	47,6
<i>N</i> -(1-naftyl)ethylendiamin	4,64	0,6	3,90	0,2	V	16,0
4-nitroanilin*						
p-aminoacetofenon	1,54	1,9	0,77	0,6	V	50,4
tyramin	5,17	0,3	4,62	0,3	V	10,7

*nemožné detegovat zónu analytu při používaných vlnových délkách

Po zvýšení teploty měření na 50 °C došlo k nárůstu efektivních elektroforetických mobilit kationtů v přítomnosti cyklodextrinu, to bylo pravděpodobně způsobeno zmenšením jeho agregátů a přispělo k tomu i snížení viskozity základního elektrolytu. Oproti měřením při 25 °C poklesly rozdíly v efektivních elektroforetických mobilitách většiny kationtů, výjimku představují anilin, L-histidin a p-aminoacetofenon. Tyto analyty interagují s cyklodextrinem silněji než při 25 °C, což podporuje teorii o specifických interakcích anilinu, L-histidinu a p-aminoacetofenonu s cyklodextrinem. Významné rozdíly v efektivních elektroforetických mobilitách kationtů přetrvaly i při 50 °C a byly výraznější než při přidavku 5 mM 2¹-O-

cinnamyl- α -cyklodextrinu do základního elektrolytu. Zvýšení koncentrace cyklodextrinu v BGE mělo vliv na snížení elektroforetické mobility všech analytů měřených ve formě kationtů, nejvíce zpožděným analytem byl p-aminoacetofenon.

Analyty ve formě aniontů byly proměřeny v základním elektrolytu tvořeném 10 mM tris(hydroxymethyl)aminomethanem, jehož pH bylo upraveno kyselinou mravenčí na požadovanou hodnotu 8,0. Nejdříve byla s těmito anionty provedena měření při 25 °C, a to jak s přídavkem, tak bez přídavku cyklodextrinu do základního elektrolytu při 25 °C. Efektivní elektroforetické mobility získané měřením za těchto podmínek jsou porovnány v tabulce 14.

Tabulka 14. Porovnání efektivních elektroforetických mobilit aniontů měřených v BGE (pH 8,0) s 25 mM 2^I-O-cinnamyl- α -CD a při teplotě 25 °C, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z n měření ($n = 3$). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému t -testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s cyklodextrinem od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE bez cyklodextrinu a je vyjádřena v procentech.

název analytu	bez přídavku CD do BGE		s přídavkem CD do BGE		t -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
<i>N</i> -acetyl-D,L-fenylalanin	-2,92	18,1	-2,25	4,9	NV	23,1
<i>N</i> -acetyl-D,L-tryptofan	-2,79	0,3	-2,08	0,2	V	25,4
<i>N</i> -benzoyl-D,L-fenylalanin	-2,64	0,4	-1,94	0,2	V	26,4
<i>N</i> -boc-D,L-tryptofan	-2,52	0,6	-1,78	0,2	V	29,5
<i>N</i> -FMOC-D,L-valin	-2,24	1,0	-1,59	0,2	V	29,2
<i>N</i> -FMOC-D,L-alanin	-2,30	16,4	-1,64	0,2	V	28,5
<i>N</i> -FMOC-D,L-leucin	-2,16	0,2	-1,42	0,4	V	34,4
D,L-3-fenylmléčná kyselina	-3,37	0,6	-2,67	0,3	V	20,6
(<i>R</i>)-(-)-mandlová kyselina	-3,46	0,6	-2,75	0,2	V	20,6

Zvýšení koncentrace cyklodextrinu přítomného v základním elektrolytu způsobilo výrazné zpomalení všech aniontů oproti měřením provedeným s 5 mM cyklodextrinem v BGE. T-testem nebyl vyhodnocen rozdíl v efektivních elektroforetických mobilitách *N*-acetyl-D,L-fenylalaninu jako významný, jelikož měření tohoto analytu disponovalo větším rozptylem než měření ostatních aniontů. Nejsilněji interagujícím analytem byl *N*-FMOC-D,L-

leucin, jehož interakce s cyklodextrinem se zvýšila o 24 % oproti měřením provedeným při přidavku 5 mM cyklodextrinu do základního elektrolytu. (R)-(-)-mandlová kyselina byla za daných podmínek nejrychleji pohybujícím se aniontem stejně tak jako v přítomnosti 5 mM cyklodextrinu v BGE.

Pro porovnání byly provedeny stejné experimenty při 50 °C. Hodnoty efektivních elektroforetických mobilit získaných měřením aniontů v základním elektrolytu o pH 8,0 s přidavkem a bez přidavku cyklodextrinu jsou porovnány v tabulce 15.

Tabulka 15. Porovnání efektivních elektroforetických mobilit aniontů měřených v BGE (pH 8,0) s 25 mM 2¹-O-cinnamyl- α -CD a při teplotě 50 °C, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z n měření ($n = 3$). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému t -testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s cyklodextrinem od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE bez cyklodextrinu a je vyjádřena v procentech.

název analytu	bez přidavku CD do BGE		s přidavkem CD do BGE		t -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
<i>N</i> -acetyl-D,L-fenylalanin	-4,28	5,7	-3,43	7,9	V	19,8
<i>N</i> -acetyl-D,L-tryptofan	-3,87	0,5	-3,23	0,1	V	16,7
<i>N</i> -benzoyl-D,L-fenylalanin	-3,67	1,1	-2,99	1,8	V	18,7
<i>N</i> -boc-D,L-tryptofan	-3,45	0,4	-2,73	0,3	V	21,1
<i>N</i> -FMOC-D,L-valin	-3,31	4,5	-2,45	0,3	V	25,9
<i>N</i> -FMOC-D,L-alanin	-3,15	0,3	-2,67	2,1	V	15,5
<i>N</i> -FMOC-D,L-leucin	-2,96	0,3	-2,30	0,2	V	22,2
D,L-3-fenylmléčná kyselina	-4,92	0,5	-4,18	0,1	V	15,1
(R)-(-)-mandlová kyselina	-5,17	3,0	-4,25	0,4	V	17,8

Elektroforetické mobility všech analytů v základním elektrolytu s 25 mM cyklodextrinem při pH 8,0 se zvýšily se vzrůstem teploty. (R)-(-)-mandlová kyselina zůstala analytem s nejvyšší elektroforetickou mobilitou i po zvýšení teploty měření na 50 °C. Všechny měřené anionty interagovaly slaběji s cyklodextrinem při vyšší teplotě, což je patrné z poklesu rozdílů v efektivních elektroforetických mobilitách oproti měřením provedeným při 25 °C.

Tato skutečnost poukazuje na nescifické interakce analytů s agregáty cyklodextrinu. Nejvyšší pokles v interakci (o 13 %) se zvýšením teploty nastal u *N*-FMOC-D,L-alaninu.

Z údajů uvedených v této kapitole je zřejmé, že vyšší koncentrace cyklodextrinu v základním elektrolytu má zásadní vliv na zpomalování všech analytů. Nejsilněji interagujícími analyty z okruhu kationtů jsou D,L-tyrosin, D,L-fenylalanin a *p*-aminoacetofenon, zatímco nejsilněji interagující aniont představuje *N*-FMOC-D,L-leucin.

4.4 Porovnání 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu s 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem

Experimenty s přidavkem 5 mM a 25 mM cyklodextrinu do základního elektrolytu byly provedeny s 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem i 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem. Jako základní elektrolyt pro měření s kationty byla použita 0,11 M kyselina mravenčí o pH 2,3. Měření s anionty probíhalo v základním elektrolytu tvořeném 10 mM tris(hydroxymethyl)-aminomethanem, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 8,0 kyselinou mravenčí.

4.4.1 Derivatizovaný α -cyklodextrin jako 5 mM aditivum základního elektrolytu

Po měřeních s 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem byla provedena měření s 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem za totožných podmínek. Výsledné efektivní elektroforetické mobility kationtů při teplotě 25 °C byly porovnány (viz tabulka 16) s efektivními elektroforetickými mobilitami kationtů změřených s 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem.

Tabulka 16. **Porovnání efektivních elektroforetických mobilit kationtů měřených v BGE (pH 2,3) s 5 mM derivátem α -cyklodextrinu a při teplotě 25 °C**, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z n měření ($n = 3$). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému t -testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s 2¹-O-cinnamyl- α -CD od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s 3¹-O-cinnamyl- α -CD v BGE a je vyjádřena v procentech.

název analytu	s 3 ¹ -O-cinnamyl- α -CD v BGE		s 2 ¹ -O-cinnamyl- α -CD v BGE		t -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
anilin	4,25	3,9	4,27	1,5	NV	-0,4*
antipyrin	2,86	0,1	2,80	0,5	V	1,8
L-histidin	3,72	4,2	3,69	0,6	NV	0,7
D,L-tyrosin	1,33	0,1	1,34	0,1	V	-0,7*
D,L-fenylalanin	1,32	0,3	1,33	0,7	NV	-0,3*
<i>N</i> -(1-naftyl)ethylendiamin	2,92	0,4	2,88	0,4	V	1,5
4-nitroanilin	0,12	0,2	0,11	0,1	V	13,1
p-aminoacetofenon	1,47	6,0	1,44	0,7	NV	2,5
tyramin	3,43	0,2	3,38	1,2	NV	1,4

* znaménko minus indikuje vyšší efektivní elektroforetickou mobilitu kationtů v přítomnosti 2¹-O-cinnamyl- α -CD

Z údajů v tabulce 16 plyne, že nejrychleji se pohybujícím analytem je anilin jak v přítomnosti 3¹-O-cinnamyl- α -CD tak v přítomnosti 2¹-O-cinnamyl- α -CD v základním elektrolytu. Analytem o nejnižší elektroforetické mobilitě je 4-nitroanilin, který je zároveň nejsilněji interagujícím analytem s agregáty 2¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu. Mezi další silněji interagující analyty s 2¹-O-cinnamyl- α -CD se řadí antipyrin a *N*-(1-naftyl)ethylendiamin. D,L-tyrosin je analyt, který silněji interaguje s 3¹-O-cinnamyl- α -CD. To by mohlo být zapříčiněno specifickou interakcí molekuly D,L-tyrosinu s kavitou cyklodextrinu, jelikož 3¹-O-cinnamyl- α -CD vytváří menší agregáty než 2¹-O-cinnamyl- α -CD.

Elektroforetické mobility analytů ve formě kationtů při pH 2,3 a teplotě 50 °C byly proměřeny s přidavkem 5 mM 3¹-O-cinnamyl- α -CD do základního elektrolytu a porovnány (viz tabulka 17) s elektroforetickými mobilitami těchto analytů získaných měřením s 5 mM 2¹-O-cinnamyl- α -CD v základním elektrolytu.

Tabulka 17. **Porovnání efektivních elektroforetických mobilit kationtů měřených v BGE (pH 2,3) s 5 mM derivátem α -cyklodextrinu a při teplotě 50 °C**, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z n měření ($n = 3$). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému t -testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s 2¹-O-cinnamyl- α -CD od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s 3¹-O-cinnamyl- α -CD v BGE a je vyjádřena v procentech.

název analytu	s 3 ¹ -O-cinnamyl- α -CD v BGE		s 2 ¹ -O-cinnamyl- α -CD v BGE		t -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
anilin	6,09	4,5	5,94	5,4	NV	2,4
antipyrin	4,19	0,3	4,02	0,7	V	4,2
L-histidin	4,94	4,0	5,21	0,4	NV	-5,3*
D,L-tyrosin	1,93	0,7	1,86	0,6	V	3,6
D,L-fenylalanin	1,94	1,8	1,81	2,1	V	7,1
N-(1-naftyl)ethylendiamin	4,51	1,0	4,31	0,7	V	4,5
4-nitroanilin	0,15	1,3	0,13	0,5	V	9,5
p-aminoacetofenon	1,55	3,7	1,50	0,4	NV	2,7
tyramin	5,09	2,6	4,91	0,3	NV	3,5

* znaménko minus indikuje vyšší efektivní elektroforetickou mobilitu kationtů v přítomnosti 2¹-O-cinnamyl- α -CD

Zvýšením teploty měření z 25 na 50 °C došlo ke zrychlení všech analytů z důvodu snížení viskozity základního elektrolytu. Zároveň se u většiny analytů projevily nespecifické interakce s většími agregáty 2¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu. Největší vzrůst rozdílu v interakcích nastal u D,L-fenylalaninu, který prokazatelně interagoval silněji s 2¹-O-cinnamyl- α -CD než s 3¹-O-cinnamyl- α -CD. Ke změně oproti měření při 25 °C došlo mimo jiné u D,L-tyrosinu, který interaguje silněji s 2¹-O-cinnamyl- α -CD. Lze předpokládat, že změna interakce D,L-tyrosinu byla způsobena redukcí velikosti agregátů 2¹-O-cinnamyl- α -CD a zpřístupněním kavit cyklodextrinu pro interakci s molekulami D,L-tyrosinu.

V základním elektrolytu tvořeném 10 mM tris(hydroxymethyl)aminomethanem, jehož pH bylo upraveno kyselinou mravenčí na hodnotu 8,0, byly proměřeny elektroforetické mobility analytů ve formě aniontů v přítomnosti 5 mM cyklodextrinu. Z hodnot elektroforetických mobilit byly vypočítány efektivní elektroforetické mobility aniontů, které

byly porovnány (viz tabulka 18) s efektivními elektroforetickými mobilitami aniontů změřených v přítomnosti 2^I-O-cinnamyl- α -CD.

Tabulka 18. **Porovnání efektivních elektroforetických mobilit aniontů měřených v BGE (pH 8,0) s 5 mM derivátem α -cyklodextrinu a při teplotě 25 °C**, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z n měření ($n = 3$). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému t -testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s 2^I-O-cinnamyl- α -CD od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s 3^I-O-cinnamyl- α -CD v BGE a je vyjádřená v procentech.

název analytu	s 3 ^I -O-cinnamyl- α -CD v BGE		s 2 ^I -O-cinnamyl- α -CD v BGE		t -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
<i>N</i> -acetyl-D,L-fenylalanin	-2,71	1,8	-2,75	3,1	NV	-1,5*
<i>N</i> -acetyl-D,L-tryptofan	-2,44	4,3	-2,50	4,8	NV	-2,3*
<i>N</i> -benzoyl-D,L-fenylalanin	-2,42	1,4	-2,40	6,7	NV	1,2
<i>N</i> -boc-D,L-tryptofan	-2,45	1,2	-2,23	2,0	V	9,2
<i>N</i> -FMOC-D,L-valin	-1,95	2,7	-2,00	0,1	V	-2,9*
<i>N</i> -FMOC-D,L-alanin	-2,20	0,6	-2,10	0,8	V	4,1
<i>N</i> -FMOC-D,L-leucin	-2,07	0,9	-1,94	1,3	V	6,3
D,L-3-fenylmléčná kyselina	-3,01	0,1	-3,18	1,3	V	-5,9*
(<i>R</i>)-(-)-mandlová kyselina	-3,32	0,6	-3,20	15,6	NV	3,6

* znaménko minus indikuje vyšší efektivní elektroforetickou mobilitu aniontů v přítomnosti 2^I-O-cinnamyl- α -CD

Mezi analyty silněji interagující s 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem patří *N*-boc-D,L-tryptofan, *N*-FMOC-D,L-alanin a *N*-FMOC-D,L-leucin. U *N*-FMOC-D,L-valinu a D,L-3-fenylmléčné kyseliny se naopak projeví silnější interakce s 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem.

Efektivní elektroforetické mobility těchto analytů byly proměřeny při teplotě 50 °C s přídatkem 5 mM 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu. Vypočtené hodnoty byly porovnány s efektivními elektroforetickými mobilitami získanými měřeními aniontů s přídatkem 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu do základního elektrolytu a jsou uvedeny v tabulce 19.

Tabulka 19. **Porovnání efektivních elektroforetických mobilit aniontů měřených v BGE (pH 8,0) s 5 mM derivátem α -cyklodextrinu a při teplotě 50 °C**, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z n měření ($n = 3$). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému t -testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s 2^I-O-cinnamyl- α -CD od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s 3^I-O-cinnamyl- α -CD v BGE a je vyjádřena v procentech.

název analytu	s 3 ^I -O-cinnamyl- α -CD v BGE		s 2 ^I -O-cinnamyl- α -CD v BGE		t -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
<i>N</i> -acetyl-D,L-fenylalanin	-3,97	0,6	-4,23	2,0	V	-6,5*
<i>N</i> -acetyl-D,L-tryptofan	-3,72	0,2	-3,48	1,5	V	6,6
<i>N</i> -benzoyl-D,L-fenylalanin	-3,54	0,2	-3,45	1,7	V	2,4
<i>N</i> -boc-D,L-tryptofan	-3,40	0,6	-3,10	1,3	V	8,8
<i>N</i> -FMOC-D,L-valin	-3,04	0,6	-3,14	2,4	NV	-3,2*
<i>N</i> -FMOC-D,L-alanin	-3,20	0,9	-3,08	1,5	NV	3,5
<i>N</i> -FMOC-D,L-leucin	-2,98	2,9	-2,89	1,2	NV	3,3
D,L-3-fenylmléčná kyselina	-4,62	0,1	-4,83	1,09	NV	-4,7*
(<i>R</i>)-(-)-mandlová kyselina	-4,87	1,9	-4,92	1,28	NV	-1,1*

* znaménko minus indikuje vyšší efektivní elektroforetickou mobilitu aniontů v přítomnosti 2^I-O-cinnamyl- α -CD

S nárůstem teploty na 50 °C se zvýšily efektivní elektroforetické mobility všech aniontů. *N*-boc-D,L-tryptofan je aniontem silněji interagujícím s 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem, stejně tak jako při měření při 25 °C. V roli analytů silněji interagujících s 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem dále vystupují *N*-acetyl-D,L-tryptofan a *N*-benzoyl-D,L-fenylalanin. *N*-acetyl-D,L-fenylalanin je naopak analytem, který vykazuje významnější interakce s 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem.

Z předešlých tabulek v této kapitole je zřejmé, že největší rozdíly mezi dvěma deriváty α -cyklodextrinu se projevily v interakcích s 4-nitroanilinem, jenž silněji interagoval s 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem. Při porovnání derivátů α -cyklodextrinu na okruhu analytů měřených ve formě aniontů byly zaznamenány silnější interakce *N*-boc-D,L-tryptofanu s 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem při 25 i 50 °C, zatímco D,L-3-fenylmléčná kyselina interagovala silněji s 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem při 25 °C a *N*-acetyl-D,L-fenylalanin při 50 °C.

4.4.2 Derivatizovaný α -cyklodextrin jako 25 mM aditivum základního elektrolytu

Elektroforetické mobility všech analytů byly proměřeny i při vyšší koncentraci 3^I-cinnamyl- α -cyklodextrinu, aby bylo možné je porovnat s hodnotami získanými při měřeních s 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem. V tabulce 20 je provedeno porovnání vlivu přidavku 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu a 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu na efektivní elektroforetické mobility kationtů při 25 °C.

Tabulka 20. **Porovnání efektivních elektroforetických mobilit kationtů měřených v BGE (pH 2,3) s 25 mM derivátem α -cyklodextrinu a při teplotě 25 °C**, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z n měření ($n = 3$). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému t -testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s 2^I-O-cinnamyl- α -CD od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s 3^I-O-cinnamyl- α -CD v BGE a je vyjádřena v procentech.

název analytu	s 3 ^I -O-cinnamyl- α -CD v BGE		s 2 ^I -O-cinnamyl- α -CD v BGE		t -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
anilin	3,87	5,0	3,74	2,6	NV	3,3
antipyrin	2,46	1,1	2,23	0,1	V	9,2
L-histidin	3,31	0,8	3,26	0,1	NV	1,5
D,L-tyrosin	1,16	0,8	0,73	0,3	V	37,2
D,L-fenylalanin	1,13	1,3	0,69	0,15	V	38,8
<i>N</i> -(1-naftyl)ethylendiamin	1,47	8,7	2,51	0,1	V	-70,9 ^b
4-nitroanilin ^a						
p-aminoacetofenon	1,13	4,3	7,62	0,2	V	32,6
tyramin	3,01	0,4	3,05	0,1	V	-1,2 ^b

^a nemožné detegovat zónu analytu při používaných vlnových délkách

^b znaménko minus indikuje vyšší efektivní elektroforetickou mobilitu kationtů v přítomnosti 2^I-O-cinnamyl- α -CD

Významné rozdíly mezi přidavkem 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu a 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu do základního elektrolytu se projevily u antipyrinu, D,L-tyrosinu, D,L-fenylalaninu, *N*-(1-naftyl)ethylendiaminu, p-aminoacetofenonu a tyraminu. Zatímco antipyrin, D,L-tyrosin, D,L-fenylalanin a p-aminoacetofenon interagují významněji s 2^I-O-cinnamyl- α -

cyklodextrinem, *N*-(1-naftyl)ethylendiamin a tyramin silněji interagují s 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem. Zpoždování *N*-(1-naftyl)ethylendiaminu 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem o 71 % oproti 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu nasvědčuje specifické interakci tohoto analytu s kavitou 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu.

Elektroforetické mobility analytů ve formě kationtů při pH 2,3 byly změřeny také při 50 °C s přidavkem 25 mM 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu. Tyto hodnoty byly následně porovnány s totožnými měřeními provedenými s 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem a výsledky jsou uvedeny v tabulce 21.

Tabulka 21. **Porovnání efektivních elektroforetických mobilit kationtů měřených v BGE (pH 2,3) s 25 mM derivátem α -cyklodextrinu a při teplotě 50 °C**, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z *n* měření (*n* = 3). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému *t*-testu na hladině významnosti α = 0,05. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s 2^I-O-cinnamyl- α -CD od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s 3^I-O-cinnamyl- α -CD v BGE a je vyjádřena v procentech.

název analytu	s 3 ^I -O-cinnamyl- α -CD v BGE		s 2 ^I -O-cinnamyl- α -CD v BGE		<i>t</i> -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
anilin	5,61	3,0	4,72	3,7	V	16,0
antipyrin	3,71	2,3	3,49	0,2	NV	6,0
L-histidin	4,90	5,0	4,51	0,6	NV	7,9
D,L-tyrosin	1,71	4,38	1,08	0,6	V	36,6
D,L-fenylalanin	1,72	5,3	1,02	1,0	V	40,7
<i>N</i> -(1-naftyl)ethylendiamin	3,21	0,3	3,90	0,24	V	-21,3 ^b
4-nitroanilin ^a						
p-aminoacetofenon	1,34	9,9	0,77	0,58	V	43,1
tyramin	4,56	2,8	4,62	0,3	NV	-1,1 ^b

^a nemožné detegovat zónu analytu při používaných vlnových délkách

^b znaménko minus indikuje vyšší efektivní elektroforetickou mobilitu kationtů v přítomnosti 2^I-O-cinnamyl- α -CD

Zvýšením teploty měření na 50 °C došlo k vzrůstu efektivních elektroforetických mobilit kationtů kvůli snížení viskozity základního elektrolytu. Oproti měřením při 25 °C

došlo k nárůstu rozdílu v interakcích anilinu s 3¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem a 2¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem. Analyty silněji interagujícími s 2¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem byly i v tomto případě D,L-tyrosin, D,L-fenylalanin a p-aminoacetofenon. *N*-(1-naftyl)ethylendiamin zůstal analytem interagujícím silněji s 3¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem.

Elektroforetické mobility analytů ve formě aniontů byly proměřeny při pH 8,0 s přidavkem 25 mM 3¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu při teplotě 25 °C. Tyto hodnoty byly porovnány (viz tabulka 22) s hodnotami efektivních elektroforetických mobilit aniontů změřených s přidavkem 25 mM 2¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu.

Tabulka 22 Porovnání efektivních elektroforetických mobilit aniontů měřených v BGE (pH 8,0) s 25 mM derivátem α -cyklodextrinu a při teplotě 25 °C, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z *n* měření (*n*=3). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému *t*-testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s 2¹-O-cinnamyl- α -CD od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s 3¹-O-cinnamyl- α -CD v BGE a je vyjádřena v procentech.

název analytu	s 3 ¹ -O-cinnamyl- α -CD v BGE		s 2 ¹ -O-cinnamyl- α -CD v BGE		<i>t</i> -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
<i>N</i> -acetyl-D,L-fenylalanin	-2,14	0,7	-2,25	4,9	NV	-5,1*
<i>N</i> -acetyl-D,L-tryptofan	-2,18	4,5	-2,08	0,2	NV	4,7
<i>N</i> -benzoyl-D,L-fenylalanin	-1,99	0,5	-1,94	0,2	V	2,4
<i>N</i> -boc-D,L-tryptofan	-1,85	0,8	-1,78	0,2	V	3,9
<i>N</i> -FMOC-D,L-valin	-1,60	2,4	-1,59	0,2	NV	0,7
<i>N</i> -FMOC-D,L-alanin	-1,70	0,1	-1,64	0,2	V	3,3
<i>N</i> -FMOC-D,L-leucin	-1,53	0,8	-1,42	0,4	V	7,0
D,L-3-fenylmléčná kyselina	-2,75	4,0	-2,67	0,3	NV	2,8
(<i>R</i>)-(-)-mandlová kyselina	-2,98	4,5	-2,75	0,2	NV	7,6

* znaménko minus indikuje vyšší efektivní elektroforetickou mobilitu aniontů v přítomnosti 2¹-O-cinnamyl- α -CD

Nejrychlejší anion představuje (*R*)-(-)-mandlová kyselina jak při přidavku 3¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu tak s přidavkem 2¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu. Naopak nejpomalěji se pohybujícím aniontem je *N*-FMOC-D,L-leucin. Významné rozdíly v interakcích

s cyklodextriny byly zaznamenány u *N*-benzoyl-D,L-fenylalaninu, *N*-boc-D,L-tryptofanu, *N*-FMOC-D,L-alaninu a *N*-FMOC-D,L-leucinu. Tyto rozdíly byly pravděpodobně způsobeny nespecifickými interakcemi analytů s agregáty 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu.

Tytěž anionty byly podrobeny experimentům s přidavkem 25 mM 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu do základního elektrolytu o pH 8,0 a při teplotě 50 °C. Získané hodnoty efektivních elektroforetických mobilit aniontů byly porovnány s hodnotami získanými pomocí měření za stejných podmínek s přidavkem 25 mM 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu. Tyto hodnoty jsou porovnány v tabulce 23.

Tabulka 23. Porovnání efektivních elektroforetických mobilit aniontů měřených v BGE (pH 8,0) s 25 mM derivátem α -cyklodextrinu a při teplotě 50 °C, kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická mobilita vyjádřená mediánem z *n* měření (*n* = 3). Dva výběry byly podrobeny dvousměrnému *t*-testu na hladině významnosti α = 0,05. „V“ představuje odlišnost středních hodnot dvou výběrů efektivních elektroforetických mobilit a „NV“ představuje statisticky nevýznamnou odlišnost dvou výběrů. Rozdíl μ_{eff} je hodnota získaná odečtením efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s 2^I-O-cinnamyl- α -CD od efektivní elektroforetické mobility analytu v BGE s 3^I-O-cinnamyl- α -CD v BGE a je vyjádřena v procentech.

název analytu	s 3 ^I -O-cinnamyl- α -CD v BGE		s 2 ^I -O-cinnamyl- α -CD v BGE		<i>t</i> -test	rozdíl μ_{eff} [%]
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-8}$ [m ² /V.s]	RSD [%]		
<i>N</i> -acetyl-D,L-fenylalanin	-3,70	0,5	-3,43	7,9	NV	7,2
<i>N</i> -acetyl-D,L-tryptofan	-3,41	0,3	-3,23	0,1	V	5,3
<i>N</i> -benzoyl-D,L-fenylalanin	-3,19	0,5	-2,99	1,8	V	6,4
<i>N</i> -boc-D,L-tryptofan	-3,05	0,1	-2,73	0,3	V	10,7
<i>N</i> -FMOC-D,L-valin	-2,73	0,3	-2,45	0,3	V	10,2
<i>N</i> -FMOC-D,L-alanin	-2,81	0,1	-2,66	2,1	NV	5,3
<i>N</i> -FMOC-D,L-leucin	-2,53	0,3	-2,30	0,2	V	8,9
D,L-3-fenylmléčná kyselina	-4,27	1,8	-4,18	0,1	NV	2,3
R-(-)-mandlová kyselina	-4,61	0,9	-4,25	0,4	V	7,8

Nejvyšší rozdíly v interakcích s dvěma cyklodextriny byly pozorovány u *N*-boc-D,L-tryptofan a *N*-FMOC-D,L-valin. Další anionty s významnými rozdíly představují *N*-acetyl-D,L-tryptofan, *N*-benzoyl-D,L-fenylalanin, *N*-FMOC-D,L-leucin a (*R*)-(-)-mandlová kyselina, které opět interagovaly silněji s 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem.

Tato skutečnost nasvědčuje tomu, že analyty interagují s agregáty 2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu, které jsou za daných podmínek neutrální, pohybují se rychlostí elektroosmotického toku a zadržují tak většinu kationtů i aniontů.

ZÁVĚR

Pro testování elektroforetických mobilit vybraných analytů a jejich interakce s 2¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem a 3¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem byla využita kapilární elektroforéza. Měření byla prováděna v základních elektrolytech o pH 2,3 a 8,0. Jako optimální základní elektrolyt byla zvolena 0,11 M kyselina mravenčí o pH 2,3 a 10 mM TRIS, jehož pH bylo nastaveno kyselinou mravenčí na hodnotu 8,0. Během experimentů a jejich vyhodnocování bylo zjištěno, že nejvýznamnější roli v interakci mezi analyty a deriváty cyklodextrinů hrají nespecifické interakce s agregáty cyklodextrinů. Tento závěr byl vyvozen na základě porovnání elektroforetických mobilit analytů při 5 a 25 mM koncentraci cyklodextrinu v základním elektrolytu. V přítomnosti 5 mM 2¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu vykazoval nejsilnější interakci s cyklodextrinem 4-nitroanilin a *N*-(1-naftyl)ethylendiamin v kyselém základním elektrolytu jak při 25 °C, tak i při 50 °C. V případě významněji interagujících aniontů se jednalo o *N*-boc-D,L-tryptofan, *N*-FMOC-D,L-valin a *N*-FMOC-D,L-leucin při 25 °C a *N*-benzoyl-D,L-fenylalanin, *N*-acetyl-D,L-tryptofan a *N*-boc-D,L-tryptofan při 50 °C. Při zvýšení koncentrace 2¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu na 25 mM se projevil významné interakce všech měřených kationtů, avšak nejsilněji interagoval D,L-tyrosin, D,L-fenylalanin a p-aminoacetofenon. Snížení elektroforetických mobilit aniontů v přítomnosti 25 mM 2¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu bylo významné u všech analytů měřených při pH 8,0 kromě *N*-acetyl-D,L-fenylalaninu, jehož rozdíl v elektroforetických mobilitách nebyl vyhodnocen dvouvýběrovým t-testem jako významný z důvodu většího rozptylu měření.

Porovnání 2¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu s 3¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem poskytlo důkaz o silnější interakci většiny analytů s 2¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu. Ten tvoří větší agregáty ve vodném prostředí než 3¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem, a tak jsou analyty více zpomalovány nespecifickými interakcemi s většími agregáty 2¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu. Vyjimku představuje *N*-(1-naftyl)ethylendiamin, který byl významněji zpomalen 25 mM 3¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinem při 25 i 50 °C, což lze považovat za projev specifické interakce s kavitou 3¹-O-cinnamyl- α -cyklodextrinu.

Zvýšení teploty měření z 25 na 50 °C přineslo zvýšení elektroforetických mobilit všech analytů s přidavkem i bez přidavku cyklodextrinu do základního elektrolytu. Tento jev byl

pravděpodobně způsoben poklesem viskozity základního elektrolytu. Dalším trendem projevujícím se při všech měřeních bylo snižování rozdílů v elektroforetických mobilitách analytů, kdy při 25 °C interagovaly silněji a zvýšením teploty měření na 50 °C došlo k poklesu interakce s cyklodextriny i o desítky procent. Tento fenomén mohl být důsledkem zmenšení agregátů cyklodextrinů s rostoucí teplotou.

2^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrin a 3^I-O-cinnamyl- α -cyklodextrin mohou být využity při optimalizaci elektroforetických metod, které se zabývají separacemi směsí derivatizovaných aminokyselin silněji interagujících s deriváty α -cyklodextrinu. Tyto deriváty by mohly být využity i při vyvíjení enantioselektivních separací, avšak u testovaných chirálních analytů nebyly pozorovány separace jednotlivých enantiomerů.

SEZNAM LITERATURY

1. Silva M.: Micellar electrokinetic chromatography: A practical overview of current methodological and instrumental advances. In: *Electrophoresis*. **2011**, 32, 149-165.
2. El Deeb S., Abu Iriban M., Gust R.: MEKC as a powerful growing analytical technique. In: *Electrophoresis*. **2011**, 32, 166-183.
3. Ryan R., McEvoy E., Donegan S., Power J., Altria K.: Recent developments in the methodology and application of MEEKC. In: *Electrophoresis*. **2011**, 32, 184-201.
4. Kašička V.: recent advances in CE and CEC of peptides (2007-2009). In: *Electrophoresis*. **2010**, 31, 122-146.
5. Mikšík I., Sedláková P.: Capillary electrochromatography of proteins and peptides. In: *Journal of Separation Science*. **2007**, 30, 1686-1703.
6. Scherz H., Huck C. W., Bonn G. K.: CEC and EKC of natural compounds. In: *Electrophoresis*. **2007**, 28, 1645-1657.
7. Mikšík I., Sedláková P., Mikulíková K., Eckhardt A., Cserhati T., Horváth T.: Matrices for capillary gel electrophoresis-a brief overview of uncommon gels. In: *Biomedical Chromatography*. **2006**, 20, 458-465.
8. Křížek T., Coufal P., Bosáková Z., Tesařová E., Sobotníková-Suchánková J.: Fyzikální gely v kapilární elektroforéze a jejich uplatnění v analýze bílkovin. In: *Chemické Listy*. **2009**, 103, 130-135.
9. Lacher N. A., Roberts R. K., He Y., Cargill H., Kearns K. M., Holovics H., Ruesch M. N.: Development, validation, and implementation of capillary gel electrophoresis as a replacement for SDS-PAGE for purity analysis of IgG2 mAbs. In: *Journal of Separation Science*. **2010**, 33, 218-227.
10. Mikšík I., Sedláková P., Mikulíková K., Eckhardt A.: Capillary electromigration methods for study of collagen. In: *Journal of Chromatography B*. **2006**, 841, 3-13.
11. Peng Y., Pallandre A., Thuy Tran N., Taverna M.: Recent innovations in protein separation on microchips by electrophoretic methods. In: *Electrophoresis*. **2008**, 29, 157-178.
12. Salieb-Beugelaar G. B., Dorfman K. D., van den Berg A., Eijkel J. C. T.: Electrophoretic separation of DNA in gels and nanostructures. In: *Lab on a Chip*. **2009**, 9, 2508-2523.
13. Pereira F., Hassard S., Hassard J., deMello A.: CE of dsDNA in low-molecular-weight polyethylene oxide solutions. In: *Electrophoresis*. **2009**, 30, 2100-2109.
14. Tia S., Herr A. E.: On-Chip technologies for multidimensional separations. In: *Lab on a Chip*. **2009**, 9, 2524-2536.
15. Dolnik V., Liu S.: Applications of capillary electrophoresis on microchip. In: *Journal of Separation Science*. **2005**, 28, 1994-2009.
16. Mizrahi S., Gun J., Kipervaser Z. G., Lev O.: Electrophoresis in Organogels. In: *Analytical Chemistry*. **2004**, 76, 5399-5404.

17. Křížek T., Coufal P., Tesařová E., Sobotníková J., Bosáková Z.: Pluronic F-127 as the buffer additive in capillary entangled polymer electrophoresis: Some fundamental aspects. In: *Journal of Separation Science*. **2010**, 33, 2458-2464.
18. Brunsveld L., Folmer B. J. B., Meijer E. W., Sijbesma R. P.: Supramolecular Polymers. In: *Chemical Reviews*. **2001**, 101, 4071-4097.
19. Fox J. D., Rowan S. J.: Supramolecular Polymerizations and Main-Chain Supramolecular Polymers. In: *Macromolecules*. **2009**, 42, 6823-6835.
20. Řezanka M., Eignerová B., Jindřich J., Kotora M.: Synthesis of Mono(perfluoroalkyl) Cyclodextrins via Cross Metathesis. In: *European Journal of Organic Chemistry*. **2010**, 32, 6256-6262.
21. Šnajdr I., Janoušek Z., Jindřich J., Kotora M.: Cross-metathesis of allylcarboranes with O-allylcyclodextrins. In: *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. **2010**, 6, 1099-1105.
22. Miyauchi M., Kawaguchi Y., Harada A.: Formation of Supramolecular Polymers Constructed by Cyclodextrins with Cinnamamide. In: *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. **2004**, 50, 57-62.
23. Jindřich J., Tišlerová I.: Simple Preparation of 3^I-O-Substituted β -Cyclodextrin Derivatives Using Cinnamyl Bromide. In: *Journal of Organic Chemistry*. **2005**, 70, 9054-9055.
24. Řezanka M., Jindřich J.: Complete sets of monosubstituted cyclomaltohexaoses (α -cyclodextrins) as precursors for further synthesis. In: *Carbohydrate Research*. **2011**, 346, 2374-2379.
25. Ševčíková P., Kašpárková V., Krejčí J., Vltavská P.: Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. In: *Chemické Listy*. **2014**, 108, 479-482.
26. Szejtli J.: Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. In: *Chemical Reviews*. **1998**, 98, 1743-1753.
27. Převzato z URL: <<http://unam.bilkent.edu.tr/~uyar/Research.html>> [cit. 17.1. 2015]
28. Horský J., Jindřich J.: Cyklodextriny ve světě polymerů. In: *Chemické Listy*. **2013**, 107, 769-776.
29. Panda S., Sahu R.: Inclusion complex with cyclodextrin: A boon to pharmaceutical world. In: *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*. **2014**, 3, 915-926.
30. Hangirgekar S. P.: A Facile β -Cyclodextrin-Catalyzed synthesis of substituted benzofuran from salicylaldehyde and alpha tosyl ketone. In: *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. **2012**, 4, 4642-4645.
31. Patil D. R., Wagh Y. B., Ingole P. G., Singh K., Dalal D. S.: β -Cyclodextrin-mediated highly efficient [2+3] cycloaddition reactions for the synthesis of 5-substituted 1H-tetrazoles. In: *New Journal of Chemistry*. **2013**, 37, 3261-3266.
32. Konkala K., Katla R., Sabbavarapu N. M., Yadavalli V. D. N.: Stereoselective Synthesis of (Z)- and (E)-Allyl Aryl Sulfides and Selenides from Baylis Hillman Acetates under Neutral Conditions Using β -Cyclodextrin in Water. In: *Helvetica Chimica Acta*. **2013**, 96, 2276-2281.

33. Rajendiran N., Mohandoss T., Saravanan J.: Guest: host interactions of lidocaine and prilocaine with natural cyclodextrins: Spectral and molecular modeling studies. In: *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **2014**, 132, 387-396.
34. Vivekanad C. K., Abhishek R. M., Gajanan M. M., Nandkishor D. P.: Zaltoprofen- β -CD Inclusion Complex for solubility Enhancement. In: *Journal of PharmaSciTech*. **2013**, 3, 37-42.
35. Huang M., Watts J. D., Bodor N.: Theoretical Studies of Inclusion Complexes of α - and β -Cyclodextrin with Benzoic Acid and Phenol. In: *International Journal of Quantum Chemistry*. **1997**, 65, 1135-1152.
36. Liu M., Dong L., Chen A., Zheng Y., Sun D., Wang X., Wang B.: Inclusion complexes of quercetin with three β -cyclodextrins derivatives at physiological pH: Spektroscopic study and antioxidant activity. In: *Spectrochimica Acta Part A*. **2013**, 115, 854-860.
37. El-Kemary M., Sobhy S., El-Daly S., Abdel-Shafi A.: Inclusion of Paracetamol into β -cyclodextrin nanocavities in solution and in the solid state. In: *Spectrochimica Acta Part A*. **2011**, 79, 1904-1908.
38. Xu C., Tang Y., Hu W., Tian R., Jia Y., Deng P., Zhang L.: Investigation of inclusion complex of honokiol with sulfobutyl ether- β -cyclodextrin. In: *Carbohydrate Polymers*. **2014**, 113, 9-15.
39. Akita T., Yoshikiyo K., Tatsuyuki Y.: Formation of 1:1 and 2:1 host-guest inclusion complexes of α -cyclodextrin with cycloalkanols: A ^1H and ^{13}C NMR spektroscopic study. In: *Journal of Molecular Science*. **2014**, 1074, 43-50.
40. Sanchez F. G., Lopez M. H., Villodres G.: Photometric Determination of Palladium with the Inclusion Complex 1,2-diaminoanthraquinone- β -Cyclodextrin as Ligand. In: *Microchimica acta*. **1987**, 2, 217-224.
41. Rogez-Florent T., Azaroual N., Goossens L., Goossens J. F., Danel C.: NMR investigation of the complexation and chiral discrimination of pyrazole sulfonamide derivatives with cyclodextrins. In: *Carbohydrate Polymers*. **2015**, 115, 598-604.
42. Hiroi T., Jin J., Takeuchi T.: Photometric detection of cyclodextrins in liquid chromatography by using iodine generated electrochemically in-situ. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2005**, 381, 1089-1094.
43. Kato T., Horikoshi K.: Colorimetric Determination of γ -Cyclodextrin. In: *Analytical Chemistry*. **1984**, 56, 1738-1740.
44. Bates S. P., Katakly R., Parker D.: a Chiral Sensor Based on a Peroctylated α -Cyclodextrin. In: *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. **1992**, 2, 153-155.
45. Matsue T., Fujihira M., Osa T.: Cyclic Voltammetric Determination of o-Nitrophenol in the Presence of p-Nitrophenol by Addition of α -Cyclodextrin. In: *Analytical chemistry*. **1981**, 53, 722-723.

46. Matsui Y., Sawada H., Mochida K., Date Y.: The Adsorption of α - and β -Cyclodextrins on the Dropping Mercury Electrode in an Aqueous Solution. In: *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. **1975**, 48, 3446-3449.
47. Hinze L. W., Pharr Y. D., Fu S. Z., Burkert G. W.: Thin-Layer Chromatography with Urea-Solubilized β -Cyclodextrin Mobile Phases. In: *Analytical Chemistry*. **1989**, 61, 422-428.
48. Salama N. N., Zaazaa E. H., Abd El Halim M. L., Salem Y. M., Abd El Fattah L.: Thin-Layer Chromatographic Enantioseparation of Ofloxacin and Zopiclone using Hydroxy-Propyl-Beta-Cyclodextrin as Chiral Selector and Thermodynamic Studies of Complexation. In: *Journal of Planar Chromatography*. **2014**, 27, 166-173.
49. Alak A., Armstrong W. D.: Thin-Layer Chromatographic Separation of Optical, Geometrical, and Structural Isomers. In: *Analytical Chemistry*. **1986**, 58, 582-584.
50. Li S., Purdy C. W.: Cyclodextrins and Their Applications in Analytical Chemistry. In: *Chemical Reviews*. **1992**, 92, 1457-1470.
51. Zhang S., Wang H., Tang J., Wang W., Tang W.: Exploration of a β -cyclodextrin clicked chiral stationary phase in high-performance liquid chromatography. In: *Analytical Methods*. **2014**, 6, 2034-2037.
52. Kawaguchi Y., Tanaka M., Nakae M., Funazo K., Shono T.: Chemically Bonded Cyclodextrin Stationary Phases for Liquid Chromatographic Separation of Aromatic Compounds. In: *Analytical Chemistry*. **1983**, 55, 1852-1857.
53. Armstrong W. D., DeMond W., Alak A., Hinze L. W., Riehl E. T., Bui H. K.: Liquid Chromatographic Separation of Diastereomers and Structural Isomers on Cyclodextrin-Bonded Phases. In: *Analytical Chemistry*. **1985**, 57, 234-237.
54. Peng Q., Yang J.: Preparation and chromatographic characteristics of a novel 2,6-dimethyl- β -CD bonded HPLC chiral stationary phase. In: *Chinese Chemical Letters*. **2014**, 25, 1416-1418.
55. Fujimura K., Ueda T., Ando T.: Retention Behavior of Some Aromatic Compounds on Chemically Bonded Cyclodextrin Silica Stationary Phase in Liquid Chromatography. In: *Analytical Chemistry*. **1983**, 55, 446-450.
56. Armstrong W. D., Stalcup M. A., Hilton L. M., Duncan D. J., Faulkner R. J., Chang S.: Derivatized Cyclodextrins for Normal-Phase Liquid Chromatographic Separation of Enantiomers. In: *Analytical Chemistry*. **1990**, 62, 1610-1615.
57. Pawlowska M., Zukowski J.: Dynamic Generation of Chiral Stationary Phase in HPLC Systems. In: *Journal of High Resolution Chromatography*. **1991**, 14, 138-140.
58. Smolková-Keulemansová E., Feltl L., Krýsl S.: Chromatographic Study of Inclusion Properties of Cyclodextrins: Study of Inclusion from the Gaseous Phase. In: *Journal of Inclusion Phenomena*. **1985**, 3, 183-196.
59. Koscielski T., Sybilska D., Belniak S., Jurczak J.: Gas-Liquid Chromatography System with α -Cyclodextrin as an Analytical Tool for the Studies of Stereoselective Hydrogenation of α -Pinene. In: *Chromatographia*. **1984**, 19, 292-296.

60. Schlenk H., Gellerman J. L., Sand D. M.: Acylated Cyclodextrins as Stationary Phases for Comparative Gas Liquid Chromatography. In: *Analytical Chemistry*. **1962**, 34, 1529-1532.
61. König W. A., Lutz S., Hagen M., Krebber R., Wenz G., Baldenius K., Ehlers J., Dieck H.: Cyclodextrins as Chiral Stationary Phases in Capillary Gas Chromatography. In: *Journal of High Resolution Chromatography*. **1988**, 11, 621-627.
62. König W. A., Krebber R., Wenz G.: Enantioselective Capillary Gas Chromatography on the Basis of Host-Guest Interactions with Modified Cyclodextrins. In: *Journal of High Resolution Chromatography*. **1989**, 12, 641-644.
63. Xiao D.-Q., Ling Y., Fu R.-N., Gu J.-L., Zhao Z.-T., Dai R.-J., Che B.-Q., Luo A.-Q.: Investigation on Five Novel Substituted β -Cyclodextrins Used as GC Stationary Phases. In: *Chromatographia*. **1998**, 47, 558-564.
64. Špánik I., Zebrowski W., Májek P., Skačáni I., Krupčík J., Armstrong D. W.: GC separation of 2-substituted ethyl propionate enantiomers on permethylated and 2,6-dimethyl-3-pentyl β - and γ -cyclodextrin stationary phases. In: *Journal of Separation Science*. **2005**, 28, 1347-1356.
65. Luong J. H. T., Nguyen A. L.: Achiral selectivity in cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. In: *Journal of Chromatography A*. **1997**, 792, 431-444.
66. Yeo S. K., Ong Ch. P., Li S. F. Y.: Optimization of High-Performance Capillary Electrophoresis of Plant Growth Regulators Using the Overlapping Resolution Mapping Scheme. In: *Analytical Chemistry*. **1991**, 63, 2222-2225.
67. Vega E. D., Lomsadze K., Chankvetadze L.: Separation of enantiomers of ephedrine by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors: Comparative CE, NMR and high resolution MS studies. In: *Electrophoresis*. **2011**, 32, 2640-2647.
68. Roos N., Ganzler K., Szemán J., Fanali S.: Systematic approach to cost- and time-effective method development with a starter kit for chiral separations by capillary electrophoresis. In: *Journal of Chromatography A*. **1997**, 782, 257-269.
69. Scriba G. K. E., Altria K.: Using Cyclodextrins to Achieve Chiral and Non-chiral Separations in Capillary Electrophoresis. In: *LC-GC Europe*. **2009**, 420-430.
70. Havlíková M.: Nově syntetizované permanentně pozitivně nabitě monosubstituované deriváty β -cyklodextrinu jako chirální selektory v kapilární elektroforéze. Diplomová práce. Praha 2014.
71. Tanaka M., Asano S., Yoshinago M., Kawaguchi Y., Tetsumi T., Shono T.: Separation of racemates by capillary zone electrophoresis based on complexation with cyclodextrins. In: *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. **1991**, 339, 63-64.
72. Lorenzo P., Villasenor A., Ramamoorthy A., Garcia A.: Optimization and validation of a capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method for amino acids determination in human plasma: Application to bipolar disorder study. In: *Electrophoresis*. **2013**, 34, 1701-1709.
73. Boeckl M., Graham D.: Self-Assembled Monolayers: Advantages of Pure Alkanethiols. In: *Material Matters*. **2006**, 1, 3-5.

74. Bain C. D., Troughton E. B., Tao Y.-T., Evall J., Whitesides G. M., Nuzzo R. G.: Formation of Monolayer Films by the Spontaneous Assembly of Organic Thiols from Solution onto Gold. In: *Journal of American Chemical Society*. **1988**, 111, 321-335.
75. Souza S., Yoshikawa D. S., Izaltino W. A. S., Assis S. L., Costa I.: Self-assembling molecules as corrosion inhibitors for 1050 aluminum. In: *Surface & Coatings Technology*. **2010**, 204, 3238-3242.
76. Stendahl J. C., Zubarev E. R., Arnold M. S., Hersam M. C., Sue H.-J., Stupp S. I.: Structural Modifications to Polystyrene via Self-Assembling Molecules. In: *Advanced Functional Materials*. **2005**, 15, 487-493.
77. Menger F. M., Littau C. A.: Gemini Surfactants: A New Class of Self-Assembling Molecules. In: *Journal of American Chemical Society*. **1993**, 115, 10083-10090.
78. Messner M., Kurkov S. V., Jansook P., Loftsson T.: Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. In: *International Journal of Pharmaceutics*. **2010**, 387, 199-208.
79. Han S., Yoon S., Nichols W. T.: Sunlight-initiated self-assembly of cyclodextrin networks. In: *Applied Surface Science*. **2012**, 261, 730-734.
80. Messner M., Kurkov S. V., Flavia-Piera R., Brewster M. E., Loftsson T.: Self-assembly of cyclodextrins: The effect of the guest molecule. In: *International Journal of Pharmaceutics*. **2011**, 408, 235-247.
81. Zhang J., Ma P. X.: Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. In: *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2013**, 65, 1215-1233.
82. Wang K., Liu Y., Li C., Cheng S.-X., Zhuo R.-X., Zhang X.-Z.: Cyclodextrin-Responsive Micelles Based on Poly(ethylene glycol)–Polypeptide Hybrid Copolymers as Drug Carriers. In: *ACS Macro Letters*. **2013**, 2, 201-205.
83. Li J.-H., Wang Y.-F., Ha W., Liu Y., Ding L.-S., Li B.-J., Zhang S.: Cyclodextrin-Based Microcapsules as Bioreactors for ATP Biosynthesis. In: *Biomacromolecules*. **2013**, 14, 2984-2988.
84. Stine K. J., Andrauskas D. M., Khan A. R., Forgo P., D'Souza V. T.: Electrochemical study of self-assembled monolayers of a β -cyclodextrin methyl sulfide covalently linked to anthraquinone. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **1999**, 465, 209-218.
85. Carrillo I., Quintana C., Esteva A. M., Hernández L., Hernández P.: Self-Assembled Submonolayer of β -Cyclodextrins on Gold Electrode for the Selective Determination of 4-Aminobiphenyl. In: *Electroanalysis*. **2011**, 23, 2862-2869.
86. Harada A., Takashima Y., Nakahata M.: Supramolecular Polymeric Materials via Cyclodextrin-Guest Interactions. In: *Accounts of Chemical Research*. **2014**, 47, 2128-2140.
87. Song Q., Li F., Tan X., Yang L., Wang Z., Zhang X.: Supramolecular polymerization of supramonomers: a way for fabricating supramolecular polymers. In: *Polymer Chemistry*. **2014**, 5, 5895-5899.

88. Ma H., Wang F., Li W., Ma Y., Yao X., Lu D., Yang Y., Zhang Z., Lei Z.:
Supramolecular assemblies of azobenzene- β -Cyclodextrin dimers and azobenzene
modified polycaprolactones. In: *Journal of Physical Organic Chemistry*. **2014**, 27, 722-
728.
89. Benkovics G.: nepublikované výsledky.
90. Jindřich J., Tišlerová I.: Simple Preparation of 3^I-O-Substituted β -Cyclodextrin
Derivatives Using Cinnamyl Bromide. In: *Journal of Organic Chemistry*. **2005**, 70, 9054-
9055.